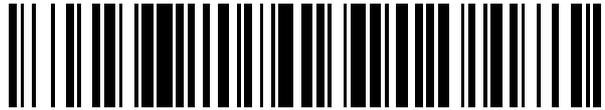


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 571**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2010 E 10832033 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2501808**

54 Título: **Presentación de proteínas diméricas de disulfuro vinculado en fagos filamentosos**

30 Prioridad:

17.11.2009 US 261767 P

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

06.09.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, CHICHI;
SPINKA-DOMS, TRACY y
FRANSSON, JOHAN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 581 571 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 de proteínas diméricas de disulfuro vinculado en fagos filamentosos****Campo de la invención**

5 La invención se refiere a composiciones y métodos para la generación y el uso de pIX bibliotecas de presentación de fagos para producir fragmentos de anticuerpos diméricos, anticuerpos enteros, u otras construcciones multiméricas de disulfuro vinculado.

Discusión del Campo

10 La exposición de fago filamentosos es una tecnología ampliamente utilizada para la selección a base de afinidad de proteínas, ya que cada partícula de fago une el ácido nucleico que codifica el polipéptido fusionado al extremo N-terminal de su proteína de revestimiento juntos en el proceso de selección. M13 bacteriófago codifica cinco proteínas de la revestimiento con aproximadamente cinco copias de las proteínas de la revestimiento de menor importancia p111 y pVI en un extremo del fago y el mismo número de pVII y pIX en el otro extremo del fago. El ADN del fago se encapsula por aproximadamente 3.000 copias de la proteína de la revestimiento principal, pVIII. Aunque la exposición de polipéptidos extraños se ha logrado con cada una de las proteínas de la revestimiento de M13, la pIII y pVIII son los compañeros de fusión más comunes. El uso de esta técnica, bibliotecas de péptidos, Fab, scFv y otras proteínas ligantes se han construido y ha encontrado su uso en diversas aplicaciones y con gran valor comercial.

20 La proteína de revestimiento pIII ha sido favorecido respecto a la proteína pVIII debido a su tamaño, conformación y bajo número de copias. La proteína de revestimiento pIII menor es un aminoácido 404, 42 kD proteína responsable de la infección del fago en E. coli que comprende tres dominios conectados por segmentos de bisagra flexible. Fusiones con el N-extremo p-III atan la proteína mostrada lejos de la superficie del fago, proporcionando potencialmente un acceso para la unión mayor que para la fusión, pequeño alto número de copia de proteína de revestimiento pVIII. La proteína pIII es esencial para los pasos iniciales de la infección y fusiones de todos, pero los pequeños péptidos y proteínas pueden interferir con este proceso. Este problema se elude, por ejemplo, mediante el uso de vectores virales que contienen una segunda copia de una proteína p111 de tipo salvaje o sistemas de fagémidos que emplean fago auxiliar. En contraste con la pIII y como pVIII, pVII y pIX son proteínas helicoidales cortas de 33 y 32 aa, respectivamente, estrechamente llenas en la superficie del fago. Sin embargo, scFv (Gao, C. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 12612-12616, 2002) y bibliotecas Fab (Shi, Let al. J Mol Biol 397, 385 396, 2010; Tornetta, M et al. J Immunol Meth 360, 39 46, 2010) se han mostrado y seleccionado en pIX. Exposición heterodimérica de Fv y péptidos ha sido descrita por la fusión de diferentes polipéptidos tanto a pVII y la estrechamente adyacente pIX (Gao, et al 1999 Proc Nat Acad Sci 96: 6025-6030 y Janda US7078166). Además, se ha informado de exposición pVII de scFv mono-específico (Kwasnikowski, et al. 2005. J Immunol Methods 307: 135). Un enfoque alternativo en el que exoproteínas codificadas por el fago o vector fagémido no se fusionen a la proteína de revestimiento, sino más bien de forma covalente se unen a proteínas de la revestimiento de nuevo por ingeniería pIII y pIX con a través de enlaces de disulfuro, también se ha descrito (US6753 136).

40 La posibilidad de mostrar una proteína dimérica en la superficie de una partícula de fago como, así como una proteína heterodimérica es ventajosa en que imitan estructuras de proteína más complejas en un formato de biblioteca combinatoria. Hay una continua necesidad de avanzar la técnica para generar métodos de alto rendimiento de cribado de variantes de proteínas complejas tales como la de la IgG humana, que es un homodímero de pares de cadena pesada y ligera (heterodímeros) conectados a través de enlaces de disulfuro intermoleculares. Hasta la fecha, no ha sido posible demostrar el correcto montaje y exhibición de cadenas completas pesadas de anticuerpos en fagos filamentosos. Las bibliotecas y métodos de esta invención cumplen estas necesidades mediante el acoplamiento de diseño integral, tecnologías de montaje y presentación de fagos pIX Fab.

50 Gao, C. et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol.(10 (12), 4057-4065 (2002) analiza pVII fusionado a "pep7".

Zwick et al. (JMB, vol.300 (2), 307-320, 2000) considera un sistema de presentación de fagos, utilizando exoproteínas fusionadas a la proteína de recubrimiento pVIII que pueden formar enlaces de disulfuro.

Documento de Estados Unidos 2003/186322 A1 se refiere a fragmentos Fv de fago estabilizado.

RESUMEN DE LA INVENCION

60 La invención proporciona un vector de fago replicable para la exposición de una proteína unida a disulfuro entrecadenas, funcional, multimérica en la superficie de una partícula de fago filamentosos; que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína pIX del fago o pVII fusionado a una secuencia de polinucleótido que codifica una primera secuencia de aminoácidos derivada de un exoproteína, en el que dicha secuencia de aminoácidos de exoproteína codificada comprende una región de bisagra de una inmunoglobulina ligada a un CH2 y CH3, incluyendo al menos un residuo de cisteína, el residuo de cisteína capaz de unirse oxidativamente a un residuo de cisteína en una segunda cadena polipeptídica expresada como una fusión de exoproteína a pIX o pVII, en el que la segunda secuencia de aminoácidos es la misma o una variante de la primera secuencia de aminoácidos; y por lo cual el lazo de cisteína así formado es un disulfuro entre cadenas de la

estructura multimérica funcional que se muestra en la superficie de la misma partícula de fago filamentoso.

La invención también proporciona una partícula de fago filamentoso que encapsula un vector que codifica un polipéptido de fusión y que tiene una proteína de disulfuro funcional, multimérica, entre cadenas, en la superficie; en la que la proteína comprende una región bisagra de una inmunoglobulina ligada a un CH2, y CH3, que tiene un residuo de cisteína fusionada a un extremo de amino de una proteína de fago filamentoso pVII o pIX, con lo cual cuando la proteína se expresa en la superficie de una proteína de fago filamentoso, los residuos de cisteína se unen oxidativamente a un resto de cisteína en una segunda cadena fusionada de polipéptido a pIX o pVII, en la que la segunda secuencia de aminoácidos es la misma o una variante de la primera secuencia de aminoácidos; y en la que el lazo de cisteína así formado es un disulfuro entre cadenas de la estructura multimérica funcional que se muestra en la superficie de la misma partícula de fago filamentoso.

La invención también proporciona una célula huésped bacteriana que comprende un fago filamentoso de la invención, en el que dicha proteína funcional es opcionalmente capaz de ser recuperada de un medio de cultivo de dicha célula huésped procarionta, tal como cuando dicha proteína aparece en la superficie de una partícula de fago filamentoso.

La invención también proporciona una proteína de fusión dimérica o multimérica expresada por una célula huésped bacteriana de la invención que tiene actividad de unión a proteína funcional medible, opcionalmente en el que la actividad de unión de proteína medible es la proteína A de unión o de unión al receptor FcRn.

La invención también proporciona una biblioteca de fagos de las células huésped bacterianas que comprende un vector de fago de ácido nucleico de la invención en posiciones específicas dentro del vector que codifica los restos discretos o dominios dentro de la secuencia del anticuerpo son abigarrado, opcionalmente en el que dichos ácidos nucleicos codifican una secuencia de formación de Fc con aminoácidos de sustitución, en el que la secuencia de formación de Pc comprende opcionalmente además un dominio de unión de ligando.

La invención también proporciona un método para producir una biblioteca de anticuerpos o fragmentos de PC en una célula huésped bacteriana de la invención, que comprende: (a) infectar una población de células huésped con una biblioteca de vectores que comprenden el polinucleótido de la invención que codifica los anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos fusionados a una proteína de revestimiento de fago; y (b) cultivar la población de células bajo condiciones que permitan la expresión de los anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprendan Fc en la superficie de fago, y (c) seleccionar el fago que presenta los anticuerpos o fragmentos de los mismos con las propiedades deseadas o mejoradas en las que las propiedades deseadas o mejoradas se seleccionan del grupo que consiste en mejorar la diana de unión, la unión a un epítipo diana específico, la afinidad de unión al receptor Fc, sitios de glicosilación disminuidos, sitios de glicosilación incrementados y estabilidad térmica mejorada.

La invención también proporciona un método de utilización de la biblioteca de fagos de la invención para la selección de variantes con propiedades mejoradas, opcionalmente en el que las propiedades se seleccionan del grupo que consiste en mejorar la diana de unión, la unión a un epítipo diana específico, afinidad de unión del receptor de Fc, sitios de glicosilación disminuidos, sitios de glicosilación incrementados, y estabilidad térmica mejorada.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

Se describe aquí un medio fácil para la exposición de proteínas vinculadas diméricas de disulfuro y estructuras más complejas en fagos filamentosos usando la proteína del revestimiento de M13, pIX. La proteína que se muestra es una proteína de fusión que comprende una proteína de revestimiento pIX, un dominio plegado, tal como un dominio CH2, vinculado a un dominio multimerizante que comprenda residuos de cisteína, tales como dominio bisagra. En una realización específica la proteína dimérica, es un homodímero en el que los miembros están vinculados a disulfuro y la proteína comprende un anticuerpo Fc. En otra realización, la proteína homodimérica de disulfuro comprende una proteína de anticuerpo humano, en el que al menos el dominio de bisagra y un dominio constante están presentes en cada uno de los polipéptidos que comprenda el homodímero y, opcionalmente, la estructura homodimérica se asocia adicionalmente con cadenas ligeras de anticuerpo independientemente expresadas mediante una formación de enlace de disulfuro.

Se describe aquí un vector replicable que codifica para al menos una proteína de fusión, que tiene una secuencia que codifica un polipéptido exógeno fusionado a una secuencia de codificación de la proteína de la revestimiento pIX, donde la porción exógena no proteína del fago es cadena de polipéptido de formación de homodímero. En una realización, el polipéptido fusionado de formación de homodímero forma una proteína de fusión Fc. En otra realización, la estructura homodimérica puede asociar adicionalmente con un heteropolipéptido para formar una estructura más compleja. En un aspecto, la exposición tanto de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo y un polipéptido de cadena ligera en una sola molécula del fago resulta en el montaje de una molécula de anticuerpo funcional en la superficie de la partícula de fago, tal como, pero no limitado a una molécula de IgG completo. Incluido en la invención son células huésped, de acuerdo con las reivindicaciones, que contienen el vector replicable y una partícula de fago, de acuerdo con las reivindicaciones, siendo capaz de mostrar el polipéptido de fusión en la

superficie del fago como una proteína ligada a disulfuro dimérica. El vector, opcionalmente, comprende polinucleótidos que codifican una señal de secreción operativamente fusionada a las secuencias de polinucleótidos que codifican la fusión de proteína de revestimiento de polipéptido mostrada.

5 También se proporcionan métodos y vectores para la construcción de una biblioteca de presentación de fagos pIX de novo, de acuerdo con las reivindicaciones, de las proteínas vinculadas a disulfuro diméricas útiles para el montaje, la detección y tales otras técnicas interrogativas como se practican en la técnica, para la selección y mejora de las composiciones de anticuerpos. Se dan a conocer en el presente documento bibliotecas de células huésped que contienen partículas de fagos que presentan una pluralidad de diferentes polipéptidos de fusión que son capaces de formar estructuras multiméricas en la superficie de la partícula del fago unido a una proteína pIX. La biblioteca puede estar codificada en un sistema de fagémido.

10 Una biblioteca descrita en este documento puede comprender una biblioteca de regiones variables de cadena pesada; puede comprender además una biblioteca de regiones variables de cadena ligera; y puede comprender además una biblioteca de regiones Fc variantes. Una biblioteca de la invención puede estar sometida a la panorámica, clasificación, u otros procedimientos de selección con el fin de identificar y aislar polinucleótidos de la biblioteca que codifican proteínas que tienen una propiedad aumentada o disminuida deseada, tales como alteración de la unión a un ligando diana o tener una unión alterada para las moléculas efectoras (por ejemplo, FcγRs y/o C1q).

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Esquema del vector de partida utilizado para expresar un Fab atado a PIX.

25 **Figura 2 A-B** Esquemas del vector fagémido pIX para una construcción de formación Fc (A) que muestra las posiciones relativas del promotor lacZ; el sitio de unión ribosomal (RIBS), que se añadió corriente arriba del péptido de señal bacteriana, pelB; la posición del enlazador flexible (G₄S), conectando la secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido de Fc, y la proteína de revestimiento de fago menor pIX o pVII; y el vector de fagémido dicistrónico (B) para la expresión de las estructuras de IgG completas en pIX.

30 **Figura 3 A-B** son gráficos que muestran los resultados de ELISA en partículas de fago recombinantes construidas como se describe en el Ejemplo 1 que demuestra el aumento de proteínas de fusión Fc (A) o EMP-1-Fc (B) donde las partículas de fagos recombinantes fueron capturadas en un chapado recubierto con Mab anti-Fc (A) o con CNTO 3443, un mAb anti EMP1 (B), y los fagos capturados se detectaron utilizando mAb anti pVIII HRP conjugado. Los fagos auxiliares eran controles negativos como fago Fc en B. Dos preparaciones individuales de fagos fueron utilizadas en los experimentos.

35 **Figura 4** es un gráfico de un ensayo de unión que muestra que los dominios Fc que aparecen en el fago son capaces de unirse a la proteína A.

40 **Figura 5A-B** son gráficos a partir de un ensayo de unión FcRn realizado en la acidez de unión óptima, pH 6,0 (superior) y bajo la condición de unión no específica, pH 7.5 (inferior).

45 **Figura 6** muestra una transferencia de Western usando anticuerpo Fc humano para la detección, domstrando la naturaleza dimérica de la proteína aislada y electroforesis bajo condiciones no reductoras, Carril 1, NR; y condiciones reductoras, Carril 2, R, mostrando que en virtud de la no reducción la banda principal es aproximadamente el doble del peso molecular respecto a la banda principal en condiciones reductoras.

50 **Figura 7 A-D** son gráficos de columnas que indican la señal producida en un formato de fago ELISA capturado de las preparaciones indicadas utilizando diversos ligandos específicos, ya sea para dominios de anticuerpos expresados en el fago, una construcción expresada EMP-1-Fc, o el propio fago y se cultivaron con o sin el IPTG lac inductor: (A) Anti-Fd (CH1) de captura de anticuerpos; (B) anticuerpo anti kappa; (C) anticuerpo anti-CH2; y (D) el anticuerpo anti-CH3. El Fab 6-2 de presentación de fago o la proteína no inmunoglobulina en pIX se incluyen como controles negativos.

55 **Figura 8** es un gráfico que muestra la columna de la señal producida en un formato ELISA para el fago capturado de la preparación indicada mediante anticuerpo comercial anti-IL13 y en presencia o ausencia de un mAb anti-IL13 soluble competidor con la misma especificidad que IL13 IgG pIX (bares cuadrados) La construcción EMP-1-Fc es un control negativo no une IL13 y 6-2 Fab IL13 específico mostrado pIX en fagos ya que una fusión pIX se incluye como un control positivo.

60 **Figura 9 A-B** son gráficos de columnas que muestra la señal producida en un formato ELISA para fagos capturados en placas por un anticuerpo anti-IL13 comercial seguido de la adición de cantidades crecientes de un anticuerpo anti-IL13 competidor (6-2 completo IgG) en fago o un anticuerpo de control no específico para IL13 (anti-EMMPRIN) (A) y por IL13 capturado en las placas por un anticuerpo anti-IL13 comercial seguido de la adición de 6-2 Fab en fago. Cantidades crecientes de cualquiera de una mAb anti-IL13 o un mAb anti-EMMPRIN se añadieron (B).

Figura 10 muestra que una señal de fago fue capturada por cualquiera de los anticuerpos específicos de dominio anti-Fd, anti-Kappa, anti-CH2 y anti-CH3 después del uso de IL13 biotinilado o antígenos IL17A para capturar constructos IgG completos que presentan fago de IL13 o IL17A y en presencia o ausencia de mAb soluble anti-IL13 competidor o mAb anti-IL17A. El fago se detectó con anticuerpo anti-M13 (y-eje).

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID	Descripción	Características
1	IgG1 Bisagra	Núcleo 11-15
2	IgG2 Bisagra	Núcleo 8-12
3	IgG3 Bisagra	Núcleo 13-61
4	IgG4 Bisagra	Núcleo 8-12
5	IgG1 CH2	
6	IgG2 CH2	
7	IgG3 CH2	
8	IgG4 CH2	
9	IgG1 CH3	
10	IgG2 CH3	
11	IgG3 CH3	
12	IgG4 CH3	
13	J-pieza	
14	pel B	P6S
15	ompA	A11P
16	EMP-1	
17	Polipéptido de tipo 1 formador de Fc Mutante IgG4	
18	Polipéptido de tipo 2 formador de Fc Mutante IgG4	
19	Dominio humano IgG1 CH1	
20	proteína humana formadora de Fc IgG1	

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Abreviaturas

ADCC = citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, ADCM = citotoxicidad mediada por monocitos dependientes de anticuerpos, c1q = factor complementario Iq, EPO = eritropoyetina recombinante, FcR = receptor Fc; Ig = inmunoglobulina; Hc = cadena pesada; Lc = cadena ligera; IPTG = isopropiltio-β-galactósido;

Definiciones

Como se usa en el presente documento, salvo que se indique lo contrario o está claro del contexto, a dominios de anticuerpos, regiones y fragmentos se otorgan definiciones estándares como son bien conocidas en la técnica. Las proteínas de la invención se derivan de, o incorporan porciones de anticuerpos de una o más clases de inmunoglobulinas. Clases de inmunoglobulinas incluyen isotipos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y, en el caso de IgG y IgA, sus subtipos, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄.

Por "cistrón" se entiende una secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN que codifica para una secuencia de aminoácido incluyendo elementos de control de expresión de ADN aguas arriba y aguas abajo.

Por "polipéptido exógeno" o "proteína exógena" o "exoproteína" se entiende una proteína normalmente no codificada por el genoma de fago filamentoso de tipo silvestre, sino que es extraño a la proteína de fago normal. Un polipéptido exógeno típico es cualquier polipéptido de interés, incluida un dominio de cadena pesada de inmunoglobulina de anticuerpo (Hc) o dominio de inmunoglobulina de cadena ligera (Lc), un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), polipéptidos naturales o sintéticos, un solo anticuerpo de cadena (scFv), o una secuencia o combinación de dominios de inmunoglobulina tal como se presentan en la naturaleza como especialmente un dominio de Fc que puede incluir CH3, CH2, una región bisagra y/o un dominio CH1 o fragmento de la misma.

Por "Fc", una etiqueta dada el fragmento cristalizante de división de un papaína IgG digerida; se entiende un fragmento funcional de un anticuerpo que comprende una estructura dimérica de las cadenas de polipéptidos

derivados de dominios constantes de anticuerpo y que tiene vínculos entre cadenas de enlaces de disulfuro. En la IgG1 humana, la papaína crea un fragmento de C-terminal para Cys226 (numerados utilizando el índice de la UE como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). El "EU index as in Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo UE humano IgG1. Aunque la definición de N-terminal de Fc puede variar, por lo general, se aprecia que incluya, al menos, residuo 223 en el sistema de numeración de Kabat, que es el tercer N-terminal de residuo a la primera cisteína de unión entre cadenas (C226 en el sistema de Kabat). La porción Fc de la molécula no está implicada directamente en contacto del anticuerpo con su antígeno diana específico, pero media las funciones efectoras. Estas funciones son de dos tipos: (1) funciones que requieren la unión del anticuerpo a un antígeno, tales como la unión Clq y/o actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o ADCC y ADMC siguiente a vinculación de tipo gamma receptor Fc para IgG, vinculación de epsilon de receptor Fc de IgE, y vinculación de tipo alfa de receptor Fc de IgA; y (2) funciones que son independientes de unión de antígeno, tales como la persistencia en la circulación por la capacidad de unir FcRn y ser transcitosado a través de barreras celulares y de tejidos (tales como el intestino). La habilidad para aumentar significativamente la vida media en suero de moléculas de anticuerpos u otras moléculas a través de la fusión de Fc, en particular, es altamente ventajoso. Moléculas de vida más larga pueden reducir la cantidad necesaria en los tratamientos clínicos, reduciendo la frecuencia de administración.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. FcR incluyen FcγRI, FcγRII, y subclases FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente unidas de estos receptores. Receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en dominios citoplasmáticos de los mismos. La activación de los receptores FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptora (FAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición de FcγRIIB contiene un motivo de inhibición a base de tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático (ver revisión en Daéron, *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, 15: 203-234; FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rdo. Immunol.*, 1991, 9: 457-92; Capel et al, *Immunomethods*, 1994, 04:25-34.; y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, 126: 330-41).

Por "polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" se entiende un polipéptido de fusión (proteína) que comprende polipéptidos codificados primero y segundo por secuencias primera y segunda de ácido nucleico, respectivamente, que están unidos operativamente. Tal como se usa en el presente documento, se entiende una proteína de fusión que contiene componentes y dominios que están "operativamente unidos", lo cual significa que los elementos fundidos de un polipéptido o polinucleótido, por ejemplo, están unidos de tal manera que cada uno realiza o funciona como se pretende. Por ejemplo, un elemento que regula la expresión, tal como un promotor, operador, o potenciador, puede ser unido operativamente a la secuencia de nucleótidos cuya expresión se va a regular. Vínculos entre los elementos pueden ser directos o indirectos, tal como a través de un enlazador. Los elementos no son necesariamente adyacentes.

El término "biblioteca" se refiere a una colección de proteínas codificadas que son variantes, es decir, cuando ciertas regiones son el mismo o similar y otras regiones varían. Las regiones de variación pueden ser por la variación dirigida o al azar (estocásticas o cambios no estocásticos). Una biblioteca o variantes pueden ser descritos en términos de número de diferentes variantes o "tamaño" de la biblioteca. Una biblioteca útil de anticuerpo *de novo* tiene una alta diversidad ($> 10^{10}$), susceptibles de alteración, fácil de montar, y tienen una bajo fondo de secuencias no deseadas. El acoplamiento de los métodos siguientes acelera el ensamblado de biblioteca y conduce a un bajo fondo: (a) mutagénesis monocatenaria a base de Kunkel; (b) bucle de capicúa con sitios de restricción y; (c) uso de un enfoque de megacebador.

Un "fagémido" o "vector de fago" es un vector de clonación y expresión que contiene componentes derivados de ambos cromosomas de fago y ADN exógeno, tal como a partir de plásmidos. Ya que el fagémido contiene una porción de un genoma de fago, después de la coinfección del huésped con un fago auxiliar, puede ser empaquetado en partículas de fago. Un fagémido puede ser empaquetado en partículas de fago M13. El vector fagémido o fago ha sido manipulado por inserción o incorporación de ADN heteróloga, tal como el ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión en el presente documento o casetes de expresión que proporcionan en este documento. Tales vectores de expresión contienen típicamente una secuencia promotora para la transcripción eficiente del ácido nucleico insertado en la célula huésped.

Visión de conjunto

Los anticuerpos naturales, que son proteínas bivalentes de unión al antígeno, se basan en dominios constantes Fc y regiones de bisagra para la asociación apropiada de las cadenas pesadas. Los dominios CH2- y CH3 se derivan preferiblemente de secuencias germinales humanas, tales como las descritos en WO2005005604 o que se puede encontrar mediante la búsqueda de bases de datos que comprenden las secuencias de secuencias de anticuerpos naturales o procesadas. En general, las construcciones de proteína descritas en este documento comprenden una región de bisagra unida a uno o más dominios constantes o partes de ellos. Por lo general, se desea incorporar todos los dominios constantes normalmente presentes en un Fc: una bisagra como se muestra en SEQ ID NO: 14 o parte del mismo que contiene uno o más residuos de cisteína u otro residuo de enlace de conformación de sulfuro o

selenosulfuro; un CH₂ como se ejemplifica por la SEQ ID NO: 5-8 o variantes de los mismos, y CH₃ como se ejemplifica por la SEQ ID NO: 9-12 o variantes del mismo, con el fin de mantener todas las funciones asociadas, tales como los receptores de la capacidad de enlace y de aumentar la persistencia en el cuerpo. Se apreciará por los expertos en la técnica, que las secuencias representadas por las que se proporcionan en este documento secuencias de dominios de anticuerpos variantes no limitantes y naturales se pueden encontrar en diversas bases de datos en Internet o en numerosas publicaciones que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención. Además, las construcciones pueden comprender, opcionalmente, algunos o todos de un dominio CH1 o algunos o la totalidad de un dominio variable de anticuerpo también puede estar presente como SEQ ID NO: 13. Estos dominios, por supuesto, estarán presentes en una plena construcción IgG. Otras secuencias de anticuerpos y secuencias no de anticuerpos pueden estar incluidas como necesarias para la expresión apropiada y el plegamiento de los dominios de anticuerpos, tales como péptidos señal o péptidos de secreción tales como los que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (pelB) y 15 (ompA). Sin embargo, la divulgación contempla estructuras inclusivas de tan sólo ciertos dominios constantes y no otros, así como estructuras en las que los dominios que no son anticuerpos derivados pueden estar presentes.

Al depender varias funciones Fc de diferentes porciones Fc, menos dominios C_H se pueden incorporar en la cadena pesada si se desea más que plena funcionalidad. Por ejemplo, la activación significativa del complemento requiere CH₂ de IgG o CH₃ de IgM. La divulgación también contempla el uso de bisagra modificada y los dominios de cadena pesada de Fc que pueden tener aminoácidos sustituidos, eliminados, insertados o modificados, siempre que las cadenas pesadas pueden asociarse en un complejo estable.

Además, la estructura dimérica unida covalentemente que típicamente formará una estructura de disulfuro también podría estar formada por la unión de selenocisteína, vinculación de homocisteína, o vinculación mixta de sulfuro de seleniuro. Además de bisagra de anticuerpo que comprende los residuos de unión covalente entre cadenas, otros dominios multimerizantes pueden estar sustituidos para formar estructuras de orden diméricas o superiores. Estos dominios multimerizantes pueden ser naturales o artificiales, tal como una única cisteína o residuos de selenocisteína o incluyen un motivo, como un motivo de cremallera de leucina, para ayudar a la asociación de polipéptidos de las proteínas de revestimiento de exoproteína de fusión de proteínas en la superficie de la partícula de fago.

En el caso de proteínas de anticuerpos completos, los heterodímeros de cadena pesada-cadena ligera se asocian a través de determinados dominios constantes de cadena pesada, para formar estructuras de orden superior. Por ejemplo, los anticuerpos de tipo IgG comprenden dos heterodímeros de la cadena ligera-cadena pesada unidas por enlace covalente en una estructura tetramérica. Ciertos otros tipos de anticuerpos comprenden estructuras tetraméricas similares que se incorporan en una estructura de orden superior que comprende, por ejemplo, dos tetrámeros (IgA) o diez tetrámeros (IgM).

En el uso de proteínas de revestimiento del fago para visualizar moléculas de exoproteína grandes, la proteína mostrada puede interferir con el ensamblaje de las partículas de fagos recombinantes si se vincula a todas las copias de la proteína de revestimiento. Con el fin de evitar la interferencia de montaje, un sistema de fagémido, tal como se describe por (Gao *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 12612-12616, 2002) para la exposición de pIX, que se utilice de modo que secuencias de codificación tanto de tipo salvaje y exoproteína vinculada están presentes en el vector y las dos proteínas están incorporadas en la partícula de fago recombinante.

Los solicitantes de la presente invención han encontrado inesperadamente que los componentes de anticuerpos que forman la parte Fc de un anticuerpo como se describe en el presente documento pueden mostrarse como una proteína de fusión a proteína de la revestimiento pIX o pVII sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso como una proteína homodimérica de disulfuro se presentan actividades biológicas conocidas del dominio Fc de un anticuerpo natural, tales como vinculación de receptor Fc, y, en forma de una proteína de unión a antígeno bivalente, capaz de unión a antígeno. Por lo tanto, en contraste con exhibición monomérica, monovalente de fragmentos de unión de anticuerpos en las partículas de fago, exhibición de multímeros de exhibición de proteínas multivalente se contempla. Así, la presente invención proporciona un sistema para la manipulación y la selección entre un espectro más completo de las características funcionales de los anticuerpos naturales. Tales características incluyen aquellas funciones Fc que promueven respuestas inmunes dirigidas contra las células que muestran un antígeno especial de interés en la superficie celular y que son componentes importantes de la actividad biológica de un anticuerpo fabricado como terapéutico. Células efectoras del sistema inmune incluyen células de antígenos específicos, tales como las células T que activan respuestas inmunes celulares y células no específicas, tales como macrófagos, neutrófilos y células aniquilantes naturales (NK) que median la respuesta inmune celular.

60 **Método de fabricación de la invención**

En la proteína de fusión que se muestra en una partícula de fago filamentoso, la "fusión" entre el polipéptido exógeno y el fago filamentoso pVII o proteína pIX pueden unirse directamente por un enlace amida, o puede comprender un polipéptido enlazador (es decir, un "enlazador"). Cualquiera de una variedad de enlazadores se pueden utilizar, que son típicamente un tramo de alrededor de 5 a 50 aminoácidos de longitud. Particularmente enlazadores preferidos proporcionan un alto grado de movilidad de la proteína de fusión en el punto del enlazador.

Enlazadores desprovistos de estructura secundaria como los que comprenden residuos predominantemente de glicina (G, Gly), tales como los que tienen G4S (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) se repite o G3S (Gly-Gly-Gly-Ser) en el que el número de repeticiones es normalmente del uno al doce, puede utilizarse para este propósito.

5 El primer polipéptido es una proteína exógena y el segundo polipéptido es una proteína de fago filamentoso pVII o pIX, por lo que la proteína exógena se fusiona con el amino terminal de la proteína del fago filamentoso. Además, cuando la proteína de fusión está en forma inmadura, es decir, donde la secuencia líder no se ha procesado (eliminado), una proteína de fusión también puede contener una señal de secreción procariótica de amino terminal, tal como una secuencia de tipo salvaje o mutante pelB o ompA (SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente) y similares como se describe en el presente documento.

15 En los anticuerpos naturales, el polipéptido de cadena ligera y las cadenas pesadas de polipéptidos se codifican y se expresan por separado. La estructura heterodimérica típica de la clase IgG de moléculas depende del montaje correcto de y formación de enlaces de disulfuro entre los cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos ligeras, de la molécula. Por lo tanto, en la presente invención, el conjunto de la porción Fc dimérica del anticuerpo y/o la asociación de las cadenas de luz, cuando está presente, recapitula el proceso natural de formación de anticuerpos en la medida que los dominios individuales de la propia proteína asociada y forman enlaces de disulfuro entre los mismos.

20 En una realización, la proteína que contiene Fc que se mostrará en la superficie de la partícula de fago filamentoso es un anticuerpo natural y un vector dicistrónico es construido para la expresión de un Fc-constructo-pIX de proteína de fusión y un anticuerpo Lc separadamente codificado y expresado o dominio de unión a antígeno que se autoasocian. Proteínas de la invención de unión a antígeno puede tener sitios de unión para cualquier epítipo, sitio antigénico o proteína. Proteínas de unión a antígeno preferido neutralizan la activación de las proteínas del receptor por la unión directa al receptor o mediante la unión a su ligando afín. En general, el dominio de unión a antígeno se formará de un anticuerpo Lc y un anticuerpo Hc dominio variable fusionado a la secuencia Hc de anticuerpo natural que comprende los dominios Fc. En otra realización, la proteína de fusión pIX incluye un scFv unido al dominio Fc. En otro aspecto de la invención, los sitios de vinculación de antígeno de las cadenas pesadas y ligeras que comprenden la scFv pueden variarse para proporcionar dos especificidades de unión diferentes, haciendo con ello que la proteína de constructo relacionado de disulfuro autoensamblado que se muestra en la superficie del fago una molécula biespecífica y bivalente. Por ejemplo, sustituido por los dominios V_L y V_H de una molécula de IgG son dominios scFv de especificidad diferente de tal manera que la molécula resultante, y es capaz de unirse a dos epítopos diferentes simultáneamente. Otros métodos de creación de moléculas de anticuerpo biespecífico que tiene varios pares de dominio variables se enseñan en US20020103345A1, que podría ser expuesto en partículas de fago utilizando los métodos de la presente invención.

40 En una realización, la unión de antígeno o el dominio de unión de receptor no es derivado de un dominio de anticuerpo pero se fusiona una secuencia peptídica conocida o aleatoria para el dominio Fc. Los péptidos bioactivos, vinculados a las cadenas alternativas del Fc, opcionalmente con un resto enlazador entre los mismos, puede ser el mismo o diferente. Los péptidos bioactivos pueden estar vinculados a enlazador interviniente o a la Fc de cualquier residuo en el péptido, siempre que el conjugado final muestra la bioactividad deseada. La bioactividad se puede medir por ensayos in vitro, por ejemplo la actividad de unión, por actividad in vivo tal como en modelos animales de enfermedad, o por la respuesta de un sujeto después de la administración del conjugado.

45 Las solicitudes copendientes de solicitantes WO04/002417; WO04/002424; WO05/081687; y WO05/032460 describe una estructura que se denomina en este documento como una estructura MIMETIBODY™, y que las estructuras se incluyen como estructuras vinculadas de disulfuro dimérico de la presente invención, que puede estar fusionado a la proteína del revestimiento del fago pIX o pVII y que aparece en la superficie exterior de la partícula de fago.

50 En una realización, el MIMETIBODY comprende un par de polipéptidos bioactivos péptido-enlazador-bisagra-CH2-CH3, el par enlazado por asociación o enlace covalente, en concreto, un enlace disulfuro Cys-Cys. El péptido bioactivo puede ser de cualquier longitud y ser una secuencia natural que se extrae de cualquier especie o de una secuencia artificial. Los péptidos generalmente se codifican por el vector fagémido y fusionado a la porción Fc de la construcción para su exposición en la partícula de fago. Un ejemplo de tal composición comprende un péptido mimético de EPO como el péptido bioactivo. Por lo tanto, un MIMETIBODY EPO-mimético CH1-eliminado imita la estructura del anticuerpo con sus propiedades inherentes y funciones, mientras se muestra un péptido terapéutico y propiedades o actividades inherentes o adquiridas in vitro, in vivo o en in situ. Otras construcciones de estructura similar también están abarcadas por la invención en las que el péptido no tiene bioactividad conocida pero presente para funcionar como marcador, una etiqueta, un antígeno, o permite la conjugación de un grupo informador, un grupo quelante, o similares.

En una realización típica de una proteína de fusión que contiene Fc o "MIMETIBODYTM" comprende la fórmula (I) que está ausente una parte o todo el dominio CH1 de inmunoglobulina:



5 donde Pep representa un péptido bioactivo o polipéptido capaz de reconocer específicamente un objetivo, Flex es un polipéptido enlazador flexible opcional que proporciona flexibilidad estructural al permitir que el MIMETIBODY tenga orientaciones alternativas y propiedades de unión, V1 y V2 son secuencias de horquillado, la bisagra es de al menos una porción de una región bisagra de inmunoglobulina, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-4, CH2 es al menos una porción de una región constante CH2 de inmunoglobulina, por ejemplo, SEQ ID NO: 5-8, CH3 es al menos una porción de una región constante CH3 inmunoglobulina, por ejemplo SEQ ID NO: 9-12; m, n y o puede ser cero o puede ser un número entero entre 1 y 10, y a puede ser un número entero de 1 a 10. La secuencia de Pep puede incluir opcionalmente secuencias para los propósitos o estabilización de cualquier número de funciones biofísicas. En una realización típica, las secuencias de horquillado se derivan de un dominio variable de anticuerpo (V) tal como un marco Vh y V1 es la secuencia QIQ y V2 representa una secuencia derivada de un dominio de gen J de inmunoglobulina y es GTLVTVSS (SEQ ID NO: 13). El polipéptido resultante se puede vincular a otros polipéptidos por asociación o enlace covalente, tales como, pero no limitado a, un enlace disulfuro Cys-Cys.

20 El nivel de expresión de proteínas de fusión de pIX, además, se puede controlar en el nivel transcripcional. Las proteínas de fusión están bajo el control inducible del sistema promotor/operador de Lac Z (véase Fig. 1). Otros promotores inducibles pueden funcionar también y son conocidos por un experto en la técnica. Para altos niveles de expresión en superficie, la biblioteca supresora es cultivada en un inductor del promotor de Lac Z tal como isopropiltio galactósido (IPTG). El control inducible es beneficioso porque la selección biológica contra las proteínas no funcionales de pIX de fusión puede ser minimizado cultivando la biblioteca bajo condiciones no expresadas. A continuación, la expresión, se puede inducir sólo en el momento de la detección para asegurar que toda la población de anticuerpos dentro de la biblioteca estén representados con precisión en la superficie del fago.

30 El vector que codifica la proteína de revestimiento del fago polipéptido de proteína de fusión de la dimerización puede incluir un codón de terminación translacional en la unión de la exoproteína de regiones de codificación de proteína de revestimiento de fago. Cuando se expresa en células bacterianas que lleve un supresor de terminación correspondiente de traducción, se produce la proteína de fusión. Cuando se exprese en una célula bacteriana sin el supresor correspondiente, exoproteína libre no se produce.

Método de uso de la invención

35 El uso de los vectores de fago ejemplificados aquí como punto de partida, las proteínas pueden ser abigarradas en posiciones de residuos específicos, discretos o en regiones tales como secuencia de glicosilación N-vinculada, comúnmente conocida como una secuencia de NXT, usando mutagénesis dirigida para generar una biblioteca de moléculas. Particularmente útil es un método de mutagénesis Kunkel modificado, el cual se puede utilizar para generar miles de millones de colonias E.coli albergándose cada una en una secuencia de exoproteína diferente. Aunque eficaz, el porcentaje de ADN no mutagenizada parental se incrementa cuando la generación de bibliotecas de secuencias de alta complejidad. Además, limitaciones técnicas de síntesis de oligonucleótidos largos reduce la eficacia del método cuando se utiliza para hacer bibliotecas que contengan las diversidades de secuencia en regiones distantes. Para superar estas limitaciones, técnicas adicionales de la generación de oligonucleótidos mayores de 350 bases se pueden utilizar. Estas técnicas incluyen el uso de un cebador mega y la creación de un bucle de tallo, secuencia que contenga un sitio de reconocimiento de enzima de restricción en la plantilla de mutagénesis en combinación con el método de mutagénesis estándar Kunkel (Kunkel et al. 1987 Methods Enzymol 154: 367-382) como se describe en US20050048617. En comparación con otras tecnologías de bibliotecas, tales como la restricción de clonación (Marks et al, 1991 J. Mol Biol 222: 581-597; Griffiths et al 1994 EMBO J.13, 3245-3260; Hoet et al. 2005 Nature Biotechnol 23 , 344-348), recombinación de fago (Gigapack, Invitrogen), y la recombinación específica de secuencia, el método a base de Kunkel mejorado es significativamente más eficaz en la generación de una biblioteca diversa de secuencia (mayor que 10⁹) y es más versátil para introducir la diversidad de secuencias en cualquier lugar en el ADN diana.

55 La exhibición de proteína que contenga Fc en fago filamentosos es especialmente útil cuando se desea para cribar una gran población de tales moléculas para las características de unión deseadas. En una realización, las células bacterianas que expresan la fusión de proteína Fc-construcción-pIX que estén infectados con una variante de M13 que permita embalaje preferencial del vector ADN que lleve el gen de fusión Fc- construcción-pIX en partículas de fago. Cada partícula de fago resultante muestra una proteína de fusión Fc-construcción-pIX particular y contiene un vector que codifica la fusión Fc-construcción-pIX. La población de tales partículas de fago puede ser enriquecidas para las características de unión deseadas mediante un procedimiento de panning. Típicamente, las partículas deseadas se inmovilizan sobre una superficie sólida revestida de un antígeno al que las partículas de fago deseadas se pueden unir. Las partículas unidas se recogen y se utilizan para infectar más células bacterianas. El procedimiento de panning se repite para enriquecer aún más las características de unión deseadas.

65 En una realización, la biblioteca de fagos se utiliza para detectar variantes de la porción Fc de las moléculas para

unión mejorada, disminuida o alterada a receptores Fc naturales o recombinantes, tales como FcRgammalll (CD16), FcRgammall (CD32), y FcRgammal (CD64).

5 Fago y otros métodos de presentación de anticuerpos ofrecen la oportunidad de manipular la selección contra el antígeno diana o receptor in vitro. Una ventaja particular de los métodos de selección in vitro es la capacidad de manipular los procedimientos de selección para obtener anticuerpos que se unen a diversos sitios en la proteína diana. Alternativamente, las células enteras se pueden usar para seleccionar aglutinantes.

10 Bibliotecas de fagos simplifican la recuperación de material genético asociado con atributos funcionales, sin embargo, se necesitan estrategias de panorama de varios pasos para aislar el mejor candidato de la biblioteca. Dominio o pannings dirigidos por epítipo se han convertido en una forma rutinaria de selección de anticuerpos que se unen a una proteína diana. Tales selecciones se han logrado principalmente mediante el empleo de una selección por etapas de anticuerpos utilizando métodos conocidos diversamente como paneo selectivo, de paneo selectivo, ligando de captura, el lavado de sustracción o la selección exploradora.

15 En panning sustractivo, objetivo(s) con sitios de unión que se solapan pero no son completamente idénticos se pueden utilizar para deseleccionar aglutinantes no deseados. Esta estrategia se ha utilizado para identificar aglutinantes incluso a antígenos desconocidos como en el uso de las células normales para deseleccionar aglutinantes a las células cancerosas. Alternativamente, las proteínas de origen naturales con algunos dominios o estructuras comunes se utilizan en la selección secuencial o la competencia para obtener anticuerpos que se unen a los sitios que difieren o son comunes entre los antígenos relacionados. En algunos casos, proteínas de origen natural tales como quimiocinas relacionadas o una versión mutada de una proteína que se puede utilizar en panning sustractivo.

25 Ligando de captura panorámica dirigida es análoga a un ensayo ELISA de tipo sándwich en que un anticuerpo inmovilizado a un epítipo adyacente irrelevante y no se utiliza para capturar y presentar la cara de unión preferida del ligando objetivo para panning de fago (US6376170). Otros han utilizado anticuerpos que compiten para enmascarar selectivamente el antígeno a otro que el dominio de destino deseado (Tsui, P. et al. 2002. J. Immunol Meth 263: 123-132). La tecnología exploradora utiliza anticuerpos monoclonales y policlonales, así como ligandos naturales conjugados directa o indirectamente con peroxidasa de rábano picante (HRP). En presencia de tiramina de biotina estas moléculas catalizan la biotinilación de la unión en estrecha proximidad con el antígeno diana del fago, permitiendo la recuperación específica de fago "etiquetado" de la población total usando estreptavidina. De este modo, la unión a diana del fago en sí, o en su proximidad inmediata, se recuperan selectivamente (Osborn, J. K. et al 1998. Immunotechnol 3: 293 302). Estos métodos, variaciones de los procedimientos, y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica se pueden emplear para consultar las bibliotecas de exoproteínas pIX de la presente invención.

Al haber descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se describirán adicionalmente en los ejemplos siguientes que no deberían estar interpretados como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

40 **EJEMPLO 1. EXHIBICIÓN DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN Fc EN pIX**

A. Construcción de vector fagémido

45 El vector de fagémido, pCGMT9 (Gao et al, Proc Natl Acad Sci 96: 6025-6030, 1999, US6472147) sirve como la columna vertebral para el desarrollo de un vector de presentación de fagémido pIX capaz de insertar la cadena pesada de dominios constantes de presentación de fagos de fusión a través de pIX. En este fagémido, orígenes de replicación para E.coli (colE1) y fago filamentoso (f1) están presentes, junto con un gen de beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina.

50 Los vectores de fagémido pIX para la exposición de las proteínas que contienen Fc, incluidas moléculas MIMETIBODYTM, se calcularon basándose en el vector de Gao, el cual había sido adaptado para la expresión bicistrónica, pCNTO-Fab-pIX, como se describe en WO2009/085462 y Fig. 1. A diferencia de la estrategia utilizada para la presentación de fagos Fab en la que una cadena ligera soluble se expresa en las mismas células y asociadas con el polipéptido atado, no soluble Fc se expresó (Figura 2A).

55 Se eliminó la secuencia en el vector de cadena ligera Fab. La secuencia en el vector de la cadena pesada de Fab fue reemplazada con Fc o una construcción o una construcción MIMETIBODYTM. La construcción del vector Fc de fagémido que contiene el par de cisteína que contiene la bisagra de núcleo que se logró de la siguiente manera. El segmento del gen Fc que codifica la bisagra de núcleo, CH2, y CH3 de IgG1 humana se amplificó a partir de un plásmido que contiene Fc por PCR. Un sitio de restricción NcoI se incorporó en el cebador 5' y un sitio de endonucleasa de restricción SacII en el extremo del cebador 3'. El fragmento de ADN amplificado por PCR y el vector de fagémido (pCNTO-Fc-pIX núcleo Hg) se digirieron con las endonucleasas de restricción NcoI y SacII. Productos digeridos se purificaron, se ligan utilizando un kit de ligadura rápida, y se transforman en DH10B Ecoli. Clones transformados fueron seleccionados utilizando la secuenciación del ADN, y después uno que mostró la secuencia correcta se transformaron en TG-1 E.coli para la preparación de fagos.

Un vector de fagémido pIX (p2467) que codifica una construcción EMP-1 (SEQ ID NO: 16) Fc (SEQ ID NO: 17), descrita en la Patente de Estados Unidos 7393662 y SEQ ID NO: 88 en el mismo, y se denomina "EPO MIMETIBODYTM" o CNTO530, fue construido mediante la sustitución de la secuencia de codificación Fc con la secuencia que codifica la proteína de fusión completa CNTO530 a través de la clonación de enzimas de restricción. La secuencia de codificación CNTO530 se amplificó a partir del plásmido p2467 por PCR. Los sitios de endonucleasas de restricción NcoI y SpeI se incluyeron en los cebadores finales '3- de '5-, respectivamente. El producto de PCR y el vector de fagémido, pCNTO-Fc-pIX núcleo Hg, se digirieron con NcoI y SpeI, se purificaron, se ligaron utilizando un kit de ligadura rápida, y se transformaron en DH10B E.coli. Clones transformados fueron seleccionados mediante secuenciación de ADN y una con la secuencia correcta se transformó en TG-1 E.coli para la exposición de fagos.

B. Preparación y caracterización del fago recombinante

TG-1 E. coli transfectados con vectores de fagémido se hicieron crecer en cultivo líquido a $OD_{600} = 0,5$ a $0,6$. VCSM13 fagos ayudante se añadió al cultivo, y la infección se desarrolló como una incubación estática a 37°C durante 45 minutos. Los cultivos se centrifugaron para sedimentar las bacterias, se resuspendieron en medio complementado con carbenicilina, canamicina e IPTG y se incubaron a 30°C durante 12-16 horas con agitación a 250 RPM. El cultivo "overnight" se centrifugó y el sobrenadante que contiene fago se transfirió a un tubo nuevo al que un volumen de un décimo de cloruro de sodio frío/solución de PEG (qué concentración de NaCl y PEG? o simplemente decir PEG precipitó usando métodos estándares (ref). Cada tubo se mezcló y se incubó en hielo durante aproximadamente tres horas con mezclado ocasional, después de lo cual el tubo se centrifugó a fago de gránulo. Gránulos de fagos se resuspendieron cuidadosamente en PBS, se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó una segunda vez para eliminar cualquier desecho celular restante. El fago purificado se almacenó en alícuotas a -80°C . Titulación del punto se realizó para estimar los títulos de fagos como unidades de formación de colonia, las (cfu) por mililitro.

C. Caracterización de proteínas expuestas

Confirmación de exhibición de construcciones Fc y de péptido Fc.

Dos preparaciones individuales de fagos fueron utilizados en los experimentos. Para detectar fago portante de Fc o portante de CNTO530, placas de ELISA negras se recubrieron con un anticuerpo anti humano Fc gamma anticuerpo policlonal específico o un anticuerpo monoclonal de péptido anti-EMP1 (CNTO 3443). Las placas rerevestimientos se bloquearon con 5% de leche en TBST y se lavaron con TBST. El fago auxiliar, fago recombinante Fc- o CNTO530 se añadieron a las placas, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, y se lavó para eliminar el fago no unido. Los fagos unidos se detectaron con un mAb anti-M13 conjugado HRP y sustrato quimioluminiscente. Los fagos capturados se detectaron utilizando el mAb conjugado HRP anti-pVIII. El fago auxiliar y, en el caso del fago auxiliar CNTO530, fago recombinante Fc sin péptido EMP1 se utilizaron como controles negativos.

Unión de proteína A. Proteína A purificada recombinante se revistió sobre las placas de ELISA Blackwell "overnight" a 4°C . Las placas de revestimiento se bloquearon con 5% de leche en TBST y se lava con TBST. Diluciones apropiadas de fago auxiliar o exhibición de fago Fc se añadieron a las placas. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y se lavan para eliminar el fago no unido. Para bloquear cualquier sitios remanentes de unión desocupados Fc en la proteína revestida A, un anticuerpo humano derivado de Fc se añadió a las placas a concentraciones de saturación. Después de incubación de 30 minutos, el fago unido se detectó con un mAb HRP conjugado anti-M13 y sustrato quimioluminiscente.

Vinculación FcRn. FcRn (el receptor neonatal Fc), permite que recaptación de anticuerpo, translocación compartimental, y recirculación y, de este modo, prolonga la vida media circulante de anticuerpos. La unión Fc es FcRn es dependiente del pH y el ensayo de unión ELISA se llevó a cabo en consecuencia. Fago vinculado FcRn se capturó en Neutravidina recubierto de placas de 96 pocillos y se detectó con mAb conjugados de HRP anti-pVIII. Brevemente, placas de ELISA black-well se recubrieron con Neutravidina y se bloqueó con una mezcla 50/50 de SuperBlock T20 (TBS) y Chemiblocker. Las placas se lavaron con TBST y FcRn biotinilado se capturó o una hora. Diluciones apropiadas de fago auxiliar o fago de exhibición Fc, se prepararon a $\text{pH} = 6$ o $\text{pH} = 7,5$ en TBST. Se añadió FcRn no unido se lavó de la placa de fago y se incubó durante una hora. Alternativamente, FcRn biotinilado se mezcló con el fago durante una hora a temperatura ambiente antes de la adición a la placa. Para bloquear los restantes sitios de unión no ocupados Fc en el FcRn recubierto, se añadió un anticuerpo humano derivado Fc a las placas a saturar la concentración. Los fagos unidos se detectaron con un mAb M13 contra HRP conjugado y sustrato quimioluminiscente.

D. Resultados

El ensayo ELISA fue diseñado para mostrar la proporción de fago de exhibición Fc, ya que el fago que presenta Fc fueron capturados utilizando un anticuerpo anti-Fc y detecta el uso de un anticuerpo anti-pVIII (Fig. 3A). La fuerte

señal observada para el fago recombinante Fc y la falta de señal observada para el fago auxiliar Fc demuestra que se visualiza de manera eficiente en la superficie del fago. Construcción de proteína de fusión EMP-1, CNTO530, la exhibición se confirmó utilizando un anticuerpo específico EMP-1 como muestra el ligando de captura: tal como se muestra en la Fig. 3B. Para confirmar que la región Fc retuvo la actividad biológica apropiada y, por lo tanto, era dimétrica, se llevaron a cabo ensayos de unión específica: proteína de unión A, y unión de FcRn. Como se muestra en la Fig. 4, fago con Fc indicado en su superficie se unen a la proteína A, mientras que el control del fago auxiliar que carece de la exhibición Fc no lo hace. Las señales quimioluminescente para la proteína A de unión son similares al del fago de exhibición de Fc capturado con anticuerpo poli clonal específico gamma inmunoglobulina humana, lo que sugiere que la mayoría de fago exhibido Fc se pliega en una conformación competente para la unión a la proteína A.

Fc se une a FcRn a pH 6,0 pero pierde varios órdenes de magnitud de la afinidad de unión a pH7,5. El fago se incubó con FcRn biotinilado a pH 6,0 (Fig. 5A) o pH 7,5 (Fig. 5B). Como se demuestra por la fuerte señal observada a pH 6,0, el fago recombinante Fc obligado de manera eficiente a FcRn a pH 6,0. En contraste, el mismo fago mostró una señal mucho más baja en todas las concentraciones ensayadas. Por lo tanto, el pH de unión dependiente fue retenido para Fc mostrado utilizando un sistema de fagémido pIX.

Moléculas que contienen IgG y Fc forman homodímeros a través de la interacción de dominios CH3. El homodímero se estabiliza por dos límites de disulfuro en su región de centro de bisagra. Debido a que el vector de exhibición de fagémido Fc codifica sólo una única copia del gen de Fc, se analizó el estado de agregación de la muestra a través de Fc Western Blot. Partículas de fago concentradas se cargaron directamente en el gel de SDS bajo condiciones reductoras o no reductoras. Como se muestra en la Figura 4, en condiciones no reductoras, la mayor parte de la proteína migró como un dímero con el peso molecular alrededor de 62kD, como se esperaba para la proteína de fusión Fc-pIX dímero. Por el contrario, en condiciones reductoras, la mayor parte de la proteína Fc-pIX migró como un monómero 31kD. Por lo tanto, la mayoría de las moléculas de Fc que aparecen en la superficie del fago son homodiméricas y vinculadas covalentemente con enlaces de disulfuro, de la misma manera que IgG u otras moléculas que contienen Fc.

E. Resumen

La fuerte señal observada para el fago recombinante junto con la falta de señal para el fago auxiliar demuestra que una construcción de agonista del receptor EPO (EMP-1) Fc se muestra de manera eficiente como se demuestra por la detección del péptido, así como Fc en partículas de fago. Los datos indican que las proteínas que contienen Fc se muestran eficaces en fagos como homodímeros que tienen características conformacionales que permiten la unión a ligandos naturales.

EJEMPLO 2: Biblioteca de fusión de péptido-Fc

Para generar una biblioteca de péptidos de fusión Fc, un fagémido de plantilla, que contiene un bucle de horquilla en el sitio de secuencias aleatorias de aminoácidos, se generó. La horquilla se diseñó de tal manera que un sitio de restricción único, XbaI, se colocó en la horquilla formada por ADN de doble cadena. Este más tarde sería utilizado para eliminar ADN de plantilla a través de digestión de restricción con XbaI, reduciendo de este modo el fago embalado con el fagémido de plantilla en la biblioteca construida final. Plásmidos de plantilla de doble cadena se transformaron en un cepa huésped *dut-ung- E. coli* CJ236, como paso a través de esta línea celular provoca incorporación de uracilo en el ADN monocatenario. El uracilo que contiene ssADN de plantilla es después degradado por enzimas de la biblioteca de célula huésped final. Una única colonia que albergaba el plásmido se cultiva en un cultivo líquido que posteriormente fue infectado con VCS-M13 de fago auxiliar. El fago se precipitó con PEG más solución salina y se utiliza para la purificación de ADN de cadena única.

Bibliotecas de ADN se generaron utilizando un protocolo de mutagénesis Kunkel modificado. Oligómeros que codifican los nucleótidos aleatorios de la biblioteca, así como secuencias de flanco 5' y 3', eran enzimáticamente fosforilados usando quinasa T4. Oligos fosforilados se templaron a sus respectivas plantillas de ssADN utilizando un programa de reducción de la temperatura de tres pasos. Se llevó a cabo la síntesis de la segunda hebra mediante la adición de polimerasa de ADN de T7 y ligasa ADN de T4 a la mezcla de reacción para formar ADN circular cerrada covalentemente (ADN-CCC). El CCC-ADN se purificó y a continuación, digerido con XbaI en la secuencia de horquilla para escindir el ADN de plantilla para reducir el fondo. Ambos productos CCC-ADN de digestión pre y post se examinaron por electroforesis en gel de agarosa para evaluar la calidad de la preparación de la biblioteca antes de su introducción en las células. Después, la mezcla de ligación se transformó a la línea celular de huésped MC1061F' (*E. coli*).

Las cuatro bibliotecas representadas pIX están construidas en las que siete (A1 y A2) u ocho (B3 y B4) aminoácidos al azar de bucle constreñido con un enlace de disulfuro cada uno en dos construcciones MIMETIBODY™ que contiene Fc (véase Fórmula 1 anterior), donde el enlazador es GGSG o GS, la pieza J de región V (SEQ ID NO: 13) está presente o ausente y la bisagra comprende cualquiera de los aminoácidos núcleo de CPPC una bisagra tipo IGGI con o sin secuencias adyacentes. Estas regiones Fc de dos variantes están representadas como se muestra a continuación, donde los residuos que difieren de IgG4 que ocurre naturalmente se subrayan, y que se representan

por SEQ ID NO: 17 y 18. Dos aminoácidos más se añadieron al azar en cada extremo del bucle limitado. bibliotecas A. 7NNK (XXCXXXXXXXXCXX)

1) Fc = IgG4 mutante con la región V y bisagra completa (SEQ ID NO: 18). 2) Fc = IgG4 mutante con núcleo de bisagra (SEQ ID NO: 17).

B. Bibliotecas 8NNK (XXCXXXXXXXXCXX)

3) Fc = IgG4 mutante con la región V y bisagra completa (SEQ ID NO: 18)

4) Fc = IgG4 mutante con núcleo de bisagra (SEQ ID NO: 17).

Para cada biblioteca generada, se realizaron un total de 31 electroporaciones. Después de la eliminación de una pequeña alícuota a título de eficiencia de transformación, cultivos de consecuencia se escalan inmediatamente hasta un volumen de cultivo de un litro que se cultivó a un OD₆₀₀ de 1,0. En este punto se dividió el cultivo: un décimo del cultivo se infectó con el fago auxiliar VCSM 13 para generar bibliotecas de fagos mientras que se utilizó la mayor parte del cultivo para establecer las reservas de glicerol de las bibliotecas bacterianas. El cultivo infectado por fago se amplió una vez más a una mayor escala y se cultivó durante la noche. Bibliotecas de fagos se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo utilizando la precipitación con PEG/NaCl en hielo. Los títulos de fago resultantes se estimaron utilizando titulación de puntos para medir el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (cfu/mL). Las alícuotas de las diluciones 1X10⁻¹⁰ y 1x10⁻¹⁰ de la preparación de titulación de punto se extendió sobre placas de medio LB suplementadas con glucosa y carbenicilina para aislar colonias individuales. Para cada biblioteca, noventa y seis colonias individuales fueron secuenciadas para evaluar la diversidad y la funcionalidad de la biblioteca de fagos final, Esto también se utilizó para determinar la cantidad de contaminación de fondo la plantilla residual proporcionó.

Resumen

Dos andamios Fc, uno con un enlazador de glicina serina corto flexible (GS), la bisagra central, CH2 y CH3 (representada por SEQ ID NO: 17) y el otro con un enlazador flexible de glicina serina (GGGS), una porción del dominio Vh, una bisagra IgG4 mutada, CH2, y CH3 (representada por SEQ ID NO: 18); bibliotecas producidas con la complejidad de aproximadamente 1-3x10⁹. La secuenciación de 96 clones de cada biblioteca mostraron que ninguna secuencia de los clones era idéntica, lo que indica que la diversidad de la biblioteca era buena.

EJEMPLO 3: EXHIBICIÓN IgG COMPLETOAEN PARTÍCULAS DE FAGO

A. Diseño del vector.

La exhibición completa de fagémido IgG (vDR47, Fig. 2B) era una construcción utilizando la construcción pCNTO Fab IX se muestra en la Fig. 1, y como se describe en WO2009/085462, que comprendía un dominio Vh y CH1 (SEQ ID NO: 19) de la cadena pesada. Las secuencias que codifican la bisagra, los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana (SEQ ID NO: 20) se añadieron, así como una secuencia de señal de variante pelB, con una sola mutación de la secuencia de tipo silvestre, P6S (SEQ ID NO: 14) , causando una mejora significativa en presentación de péptidos en proteína de revestimiento menor pVII y la secreción de proteínas (solicitud copendiente de solicitantes) y el vector no tiene un gen lacI pero tiene un promotor lac.

B. Caracterización de las construcciones utilizadas para exhibición completa IgG.

Un panel de construcciones de prueba para evaluar la exhibición completa de IgG en pIX. Los anticuerpos para IL13, designados 6-2 y 16-7, y un anticuerpo de anti-citoquinas 9-4 se eligieron como prototipos para la construcción de las nuevas moléculas completas IgG. Para determinar el efecto del diferente uso de codones, se hicieron dos construcciones para cada uno de los anticuerpos anti-IL13, uno con la optimización de codones humanos y una optimización con codon E. coli. La tabla 1 recoge la designación del vector para los cinco constructos completos de prueba de IgG. Genes optimizados se sintetizaron y se ensamblan en ADN de doble cadena como se describió en las patentes US 6.670.127 y 6.521.427. Además, el EMP-1 Fc se fusionó a pIX (Ejemplo 1) se incluyó como control, ya que contiene dominios de bisagra IgG, CH2 y CH3, pero no hay cadenas ligeras.

Tabla 1. Construcciones de ensayo para la exhibición completa de IgG

pDR#	Isotipo	Uso de Codon	Descripción	Especificidad de antígeno
pDR2129	hulgG1/HuKappa	Codon humano	6-2 completo IgG	h IL13
pDR2130	hulgG1/HuKappa	Codon humano	16-7 completo IgG	h IL13
pDR2131	hulgG1/HuKappa	Codon E. coli	6-2 completo IgG	h IL13
pDR2132	hulgG1/HuKappa	Codon E. coli	16-7 completo IgG	h IL13
pDR3041	hulgG1/HuKappa	Codon humano	9-4 completo IgG	h IL17A

C. Producción de fagos

La totalidad de los constructos de exposición IgG descritos en el apartado B anterior se transformaron en dos cepas diferentes de F' de E. coli, TG-1 y XL-1 azul, de acuerdo con los protocolos estándar. La razón para el ensayo de estas dos cepas es su diferencia en la tasa de crecimiento, que hipotéticamente podría afectar el embalaje y exhibición de la proteína de fusión completa IgG pIX. Transformantes individuales se seleccionaron y se cultivaron durante la noche en medios 2XYT suplementados con Carbenicilina (siempre se utiliza a 100 µg/ml). A continuación, se utilizó el cultivo de una noche (500 µl) para inocular 25 ml 2XYT/carbenicilina y el cultivo se cultivó a 37°C, 250 rpm, hasta que OD(600 nm) alcanzó 0,5. La bacteria fue infectada con 1011 pfu/ml de fago auxiliar VCSM13 (Stratagene, La Jolla, CA) durante 30 min de incubación a 37°C sin agitación seguido de una etapa de centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos. En este paso, el protocolo estándar requiere la inducción del cultivo bacteriano con 2XYT/Carbenicilina/IPTG (1 mM). Sin embargo, se dividió a los cultivos en dos y añadió 1 mM IPTG a uno y no al otro, con la hipótesis de que la falta de estanqueidad del sistema sería suficiente para producir la proteína de fusión con el empaquetado de fago posterior. En resumen, para cada construcción, se hicieron cuatro preparaciones de fagos diferentes: (i) TG-1 sin IPTG (ii) TG-1 sin IPTG (iii) XL-1 azul con IPTG (iv) XL-1 azul sin IPTG. Los cultivos se hicieron crecer durante la noche a 30°C a 250 rpm y al día siguiente, centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos, seguido por la precipitación del sobrenadante de fagos en PEG/NaCl. Después de 2 horas en hielo, el fago precipitado se centrifugaron a 10.000 rpm, 15 mm, y el fago precipitado se resuspendió en 2 ml de PBS. La preparación de fago se aclaró además de cualquier sedimento bacteriano restante de un centrifugado a 10.000 rpm durante 10 mm y se almacena en tubos de 2 ml en 4°C.

D. Títulos de fagos

Los títulos de fagos se determinaron de acuerdo con los protocolos estándar. Brevemente, las células TG-1 fueron cultivadas en 2XYT hasta OD(600 nm) alcanzó 0,5. Las preparaciones de fagos se diluyeron en serie en PBS en una placa de 96 pocillos y se añadieron células TG-1 al fago y se incubaron a 37°C para permitir la infección. Después de 30 min, una titulación de punto se llevó a cabo mediante la supresión de 2 µl de cada pocillo en placas de agar LB que contenían 1% de glucosa y Carbenicilina. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche y se determinó la concentración de fago en términos de unidades formadoras de colonias (cfu) por ml. La tabla 2 muestra los resultados de la valoración de fagos para todas las construcciones y condiciones de cultivo. Todos los clones produjeron altos títulos de fagos, entre 10¹¹ - 10¹³ cfu/ml que estaban en el intervalo esperado e indicó que el fago se produjo de manera eficiente.

Tabla 2.

Descripción	Vector pDR	IPTG	TG-1	XL-1 Azul
6-2 IgG Codon Humano	2129	-	1,00E+13	2,00E±13
		+	5,00E+12	5,00E±12
16-7 IgG Codon Humano	2130	-	2,00E+13	2,00E±13
		+	2,00E+12	2,00E±12
6-2 IgG E Coli Codon	21311	-	2,00E+13	2,00E±13
		+	2,00E+13	2,00E±13
16-7 IgG E Coli Codon	2132	-	2,00E+12	5,00E±12
		+	1,00E+11	5,00E±11
EMP-1 Fc Construcción	2467	-	2,00E+13	2,00E±13
		+	2,00E+12	2,00E±12

E. IgG ELISAs tipo sándwich específicos de dominio para evaluar la pantalla funcional

Para evaluar la exposición de la molécula de IgG completa de fago pIX, una serie de pruebas ELISA de sándwich se establecieron. Placas maxisorp negras se recubrieron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de uno de los siguientes anticuerpos de captura diluidos en TBS; anticuerpo de oveja anti humano IgG (Fd, CH1) (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido), cadenas ligeras de ratón anti kappa humano (Southern Biotech, Birmingham, AL), IgG (dominio CH2) anticuerpo de ratón anti humano (ABD Serotec, Raleigh, NC), y el anticuerpo IgG (dominio CH3) de ratón anti humano (ABD Serotec). Después de bloquear las placas con Chemiblocker (Chemicon/Millipore, Billerica, MA), las placas se lavaron y se añadieron los fagos a una concentración de 2×10^{11} cfu/ml (diluido en 10% Chemiblocker/TBST) e incubado durante una hora. Las placas se lavaron y anticuerpo HRP de ratón conjugado anti-M113 se añadió a las placas. Después de 30 mm de incubación, las placas se lavaron y se añadió sustrato de quimioluminiscencia a los pocillos y las placas se leyeron en el lector de placas Envision. Las figuras 7A - D muestran los resultados de la CH1 (Fig 7A), Kappa (Fig. 7B), CH2 (Fig. 7C) y CH3 (Fig. 7D) ELISA tipo sandwich, respectivamente. Controles utilizados en las pruebas ELISA eran fago que presenta la fusión Fab pIX del clon 6-2 en vDR10 (codón optimizado humano, hecho en células TG-1, la inducción de IPTG), un andamio inespecífico de proteínas de fusión de pIX, o la fusión CNTO530 pIX. En el CH1 y Kappa ELISAs, el 6-2 Fab sirve como control positivo, mientras que la molécula de construcción EMP-1 (CNTO530) sirve como un control negativo. En ELISAs CH2 y CH3, el 6-2 Fab sirve como control negativo y la molécula CNTO530 como control positivo. El fago de proteínas de andamio sirve como un control negativo en todos los ELISA ya que no lleva ningún dominio de anticuerpos. Los ensayos ELISA se realizaron también con la adición de un anticuerpo IgG1 anti-IL13 completo como un competidor soluble a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ con el fin de evitar la unión del fago a los diferentes anticuerpos de captura.

Como se muestra en las figuras 7A-D, se detectó el fago en todos los ELISA tipo sándwich, proporcionando pruebas de que el fago de hecho se presentaban los diferentes dominios de anticuerpos en la superficie. El fago producido en XL-1 azul tuvo las señales más altas y la adición de IPTG tuvo un efecto positivo en la señal de unión. La unión de fago puede ser inhibida por la adición del anticuerpo anti-IL13 soluble, lo que indica interacciones específicas. Sin embargo, el anticuerpo anti-IL13 soluble no podía competir frente a la interacción entre el fago y el dominio CH3 (Figura 7D).

Esto se observó tanto para las fusiones de IgG completas pIX, así como para la fusión EMP-1-FcpIX (CNTO530).

F. IgG pIX del fago de unión completo a IL13

Después de demostrar que todos los dominios de la molécula de IgG pueden ser detectados en las partículas de fago por las pruebas ELISA, fue necesario determinar si las construcciones también retienen la capacidad de unirse a sus respectivos antígenos. El ELISA de unión IL13 se estableció mediante el recubrimiento de placas Maxisorp negro con 1 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-IL13 (IL13 ratón anti-humano, MAB213, R&D Systems). El MAB213 no compite con 6-2 o 16-7 para la unión a IL13 y por lo tanto es ideal como un ELISA tipo sándwich de captura de anticuerpos. Después del lavado y bloqueo, se añadió biotinilado humano IL13R130Q humano (Peprotech) a 100 nM y se incubó durante una hora. Las placas se lavaron y el fago se presentan versiones IgG completos de 6-2 y 16-7 en pIX se añadieron a 2×10^{11} cfu/ml, ya sea solo o junto con un anticuerpo anti-IL13 soluble para la competencia. El fago unido se detectó con el ratón con anticuerpo HRP-conjugado razón anti-M13 y quimioluminiscencia se leyó en el instrumento Envision. La Figura 8 muestra el resultado del fago IL13 ELISA. La unión se detecta en la mayoría de condiciones, con el fago producido en XL-1 células azules con 1 mM IPTG mostrando las señales más altas. El péptido-Fc-pIX y fusiones de molécula de andamio alternativa pIX fueron negativas, como se esperaba, y el control de Fab 6-2 pIX fue positivo. La unión se inhibió mediante la adición de anticuerpo anti soluble de IL13, lo que demuestra que la interacción es específica para examinar aún más la unión de IL13, un ELISA se estableció en el que el anticuerpo de competencia soluble se diluyó en serie de 50 $\mu\text{g/ml}$ - 0,01 $\mu\text{g/ml}$. También se incluyó un anticuerpo de control. Figura 9A y B muestran el efecto de la competencia de anticuerpo soluble en unión de IL13 de 6-2 IgG pIX y 6-2 Fab pIX, respectivamente. La inhibición de la unión es vista por ambos constructos, con un IC50 de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, para el constructo completo IgG pIX, la inhibición es incompleta incluso a concentraciones muy altas de la competencia, lo que sugiere que un cierto nivel de interacciones no específicas está presente.

G. IgG completa pIX de unión a IL13 y IL17

Un segundo experimento confirmatorio se llevó a cabo. Esto se hizo mediante la clonación de una versión IgG completa de un anticuerpo anti-IL17a. La construcción se transformó en células XL-1 de células azules y el fago se produjo como se ha descrito anteriormente. ELISAs se llevaron a cabo para confirmar la exposición de IgG IL17 en pIX, así como su unión a IL17A mut6 antígeno humano como se muestra en la Figura 6. Para cada ELISA (captura de Fd, captura kappa, captura CH2, captura CH3, captura IL13, y captura IL17), el fago se añadió ya sea solo o junto con anti-IL13 mAb soluble o anti-IL17A mAb soluble. La adición de competidor mAb muestra la especificidad de la prueba ELISA. Como es evidente en la Figura 10, la IL17 IgG se muestra en pIX, aunque a niveles más bajos que IL13 IgG. Esto es consistente con diferencias en los niveles de expresión de Fab entre estos constructos (datos no mostrados). La especificidad de unión al antígeno se puede ver, al no vincular anti-IL13 IgG en fagos a IL17 y anti-IL17 IgG anti en fagos no se une a IL13. Además, la unión de cada uno de los dos tipos de fago pueden ser

inhibidos por sus homólogos mAb solubles.

Ejemplo 4: Exposición de proteínas que contienen Fc fusionadas a pVII

5 Además, hemos demostrado que las proteínas de Fc y MIMETIBODY™ se podrían mostrar en la superficie del fago utilizando un sistema de fagémido pVII.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[179]**

<110> Centocor Ortho Biotech, Inc.
 HUANG, ChiChi
 SPINKA-DOMA, Tracy
 FRANSSON, Johan

<120> PRESENTACIÓN DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS DE DISULFURO VINCULADO EN FAGOS FILAMENTOSOS

20 <130> CEN5277WOPCT

<140> TBD
 <141> Adjunto

25 <150> 61/261,767
 <151> 11/17/2010

30 <160> 20

<170> PatentIn version 3.5

35 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (11)..(15)
 <223> Núcleo Bisagra

45 <400> 1

50 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 2

55

60

65

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (4)..(12)
 <223> Núcleo Bisagra
 10
 <400> 2

 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 15
 <210> 3
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (13)..(61)
 <223> Núcleo Bisagra
 25
 <400> 3

 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15
 30
 Pro Glu Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 20 25 30
 35
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Cys Pro
 35 40 45
 40
 Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 50 55 60
 45
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (8)..(12)
 <223> Núcleo Bisagra
 50
 <400> 4

 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10
 55
 <210> 5
 60
 65

ES 2 581 571 T3

<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 5

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

10

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

15

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

20

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

25

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

30

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 6
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35

<400> 6

40

45

50

55

60

65

ES 2 581 571 T3

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 5 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 10 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 15 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95
 20 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 35 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 50 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 55 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 100 105 110

60
 65

ES 2 581 571 T3

<210> 8
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

5

10

15

20

25

30

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

35

40

45

50

55

60

65

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

ES 2 581 571 T3

5 Glu Leu Thr Lys₂₀ Asn Gln Val Ser Leu₂₅ Thr Cys Leu val Lys₃₀ Gly Phe
 Tyr Pro Ser₃₅ Asp Ile Ala Val Glu₄₀ Trp Glu Ser Asn Gly₄₅ Gln Pro Glu
 10 Asn Asn₅₀ Tyr Lys Thr Thr Pro₅₅ Pro Val Leu Asp Ser₆₀ Asp Gly Ser Phe
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu₇₀ Thr Val Asp Lys Ser₇₅ Arg Trp Gln Gln Gly₈₀
 15 Asn Val Phe Ser Cys₈₅ Ser Val Met His Glu₉₀ Ala Leu His Asn His₉₅ Tyr
 Thr Gln Lys Ser₁₀₀ Leu Ser Leu Ser Pro₁₀₅ Gly Lys
 20 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 10
 Gly Gln Pro Arg Glu₅ Pro Gln Val Tyr Thr₁₀ Leu Pro Pro Ser Arg₁₅ Glu
 30 Glu Met Thr Lys₂₀ Asn Gln Val Ser Leu₂₅ Thr Cys Leu Val Lys₃₀ Gly Phe
 35 Tyr Pro Ser₃₅ Asp Ile Ala Val Glu₄₀ Trp Glu Ser Asn Gly₄₅ Gln Pro Glu
 40 Asn Asn₅₀ Tyr Lys Thr Thr Pro₅₅ Pro Met Leu Asp Ser₆₀ Asp Gly Ser Phe
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu₇₀ Thr Val Asp Lys Ser₇₅ Arg Trp Gln Gln Gly₈₀
 45 Asn Val Phe Ser Cys₈₅ Ser Val Met His Glu₉₀ Ala Leu His Asn His₉₅ Tyr
 Thr Gln Lys Ser₁₀₀ Leu Ser Leu Ser Pro₁₀₅ Gly Lys
 50 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 11
 60
 65

ES 2 581 571 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15
 5 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 10 Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 15 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
 85 90 95
 20 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 30 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 35 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 40 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 45 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 50 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT

60
 65

ES 2 581 571 T3

<213> Homo sapiens
<400> 13
5 Gly Thr Leu Val Thr val Ser Ser
1 5
<210> 14
<211> 22
<212> PRT
<213> Erwinia carotovora
<220>
15 <221> MUTAGEN
<222> (6)..(6)
<223> X may be P or S
<400> 14
20 Met Lys Tyr Leu Leu xaa Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
25 Ala Gln Pro Ala Met Ala
20
<210> 15
<211> 21
<212> PRT
30 <213> Escherichia coli
<220>
<221> MUTAGEN
35 <222> (11)..(11)
<223> X may be A or P
<400> 15
40 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val xaa Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
45 Thr Val Ala Gln Ala
20
<210> 16
<211> 20
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Una proteína de fusión que comprende un péptido sintético bioactivo eritropoyética (EMP-1), un
enlazador sintético, y las secuencias de IgG humana.
55 <400> 16
<210> 5
60
65

ES 2 581 571 T3

1 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys
 5 Pro Gln Gly Gly
 10 <210> 17
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 15 Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 20 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 25 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 30 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 35 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 40 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 45 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 50 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 55
 60
 65

ES 2 581 571 T3

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 180 185 190
 5 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 195 200 205
 10 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215 220
 <210> 18
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys
 1 5 10
 25 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 20 25 30
 30 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 35 40 45
 35 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 50 55 60
 40 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 65 70 75 80
 45 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 85 90 95
 50 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 100 105 110
 55 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 115 120 125
 60 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 130 135 140
 65 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 145 150 155 160
 70 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 165 170 175

60

65

ES 2 581 571 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 195 200 205

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Lys

<210> 19
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val

<210> 20
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

55
 60
 65

ES 2 581 571 T3

1 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 5 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 10 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 15 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 20 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 25 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 30 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 35 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 40 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 45 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 50 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 55 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 60 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 65 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 70 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 75

REIVINDICACIONES

1. Un vector de fago replicable para la exposición de una proteína funcional, multimérica, entre cadenas de disulfuro en la superficie de una partícula de fago filamentosos; que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un pIX del fago o proteína pVII fusionada a una secuencia de polinucleótido que codifica una primera secuencia de aminoácidos derivada de un exoproteína, donde dicha exoproteína codificada de secuencia de aminoácidos comprende una región de bisagra de una inmunoglobulina ligada a un CH2, y CH3, incluyendo al menos un residuo de cisteína, el residuo de cisteína capaz de unirse oxidativamente a un residuo de cisteína en una segunda cadena de polipéptido expresado como una fusión de exoproteína a pIX o pVIII, en el que la segunda secuencia de aminoácidos es la misma que o una variante de la primera secuencia de aminoácidos; y en el que el lazo de cisteína así formado es un disulfuro entre cadenas de la estructura multimérica funcional que se muestra en la superficie de la misma partícula de fago filamentosos.
2. El vector de fago de la reivindicación 1 en la que:
- (i) la actividad funcional de la estructura de la proteína se selecciona de unión de proteína A y unión a FcRn;
 - (ii) la secuencia de aminoácidos codificada comprende un dominio bisagra del anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3 y 4, y los residuos del núcleo de SEQ ID NO: 1-3, y 4, opcionalmente en el que el disulfuro entre cadenas se encuentra dentro de la secuencia de aminoácidos de los residuos del dominio bisagra del anticuerpo o de bisagra núcleo, comprendiendo una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 5-16 y 17-20 o una variante del mismo en el que se sustituye al menos un residuo;
 - (iii) dicho ácido nucleico codifica además una señal de secreción bacteriana fusionada de manera operativa a una de las secuencias de exoproteína de codificación, opcionalmente en el que la señal de secreción bacteriana se selecciona de una secuencia PelB o una secuencia de variante PelB o es ompA o una variante de ompA como se muestra en SEQ ID NO: 14 o 15; o
 - (iv) que comprende además un promotor inducible, opcionalmente en el que el promotor inducible es un promotor lac o mutante de lac.
3. Una partícula de fago filamentosos que encapsula un vector que codifica un polipéptido de fusión y que tiene una proteína vinculada a disulfuro multimérica, funcional, entre cadenas en la superficie; donde la proteína comprende una región de bisagra de una inmunoglobulina ligada a un CH2, y CH3, que tiene un residuo de cisteína fusionada a un extremo amino terminal de una proteína pVII o pIX del fago filamentosos, con lo cual cuando la proteína se expresa en la superficie de una proteína de fago filamentosos, los residuos de cisteína se unen oxidativamente a un resto de cisteína en una segunda cadena del polipéptido fusionado a pIX o pVII, donde la segunda secuencia de aminoácidos es la misma que o una variante de la primera secuencia de aminoácidos; y en el que el lazo de cisteína así formado es un disulfuro entre cadenas de la estructura multimérica funcional que se muestra en la superficie de la misma partícula de fago filamentosos.
4. La partícula de fago filamentosos de la reivindicación 3, donde la actividad funcional de la estructura de la proteína se selecciona de la proteína A de unión y de unión a FcRn.
5. El vector de fago replicable según la reivindicación 1 o la partícula de fago filamentosos según la reivindicación 3, en el que el exoproteína comprende:
- (i) una bisagra como se muestra en SEQ ID NO: 1-4 o una porción del mismo que contiene uno o más residuos de cisteína u otro sulfuro o residuo de formación de enlace selenosulfuro;
 - (ii) un CH2 de SEQ ID NO: 5-8 o variantes del mismo; y/o
 - (iii) un CH3 de SEQ ID NO: 9-12 o variantes del mismo.
6. El vector de fago replicable según la reivindicación 1 o la partícula de fago filamentosos de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el exoproteína comprende la fórmula (I) que es ausente de una parte o todo el dominio CH1 de inmunoglobulina:
- $$V1_o\text{-Pep}_a\text{-Flex}_n\text{-V2}_m\text{-Bisagra-CH}_2\text{-CH}_3 \text{ (I)}$$
- donde Pep representa un péptido bioactivo o polipéptido capaz de reconocer específicamente un objetivo, Flex es un polipéptido enlazador flexible opcional, V1 y V2 son secuencias horquilladas, la bisagra es de al menos una porción de una región bisagra de inmunoglobulina, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-4, CH2 es al menos una porción de una región constante CH2 de inmunoglobulina, p.ej. SEQ ID NO: 5-8, CH3 es al menos una porción de una región CH3 constante de inmunoglobulina, por ejemplo, SEQ ID NO: 9-12; m, n y o puede ser cero o puede ser un número entero entre 1 y 10, y a puede ser un número entero de 1 a 10.
7. El vector de fago de la reivindicación 6, en el que las secuencias de horquillado se derivan de un dominio variable de anticuerpo (V) tal como un marco Vh.
8. El vector de fago de la reivindicación 7, en la que Vi es la secuencia de QIQ y V2 representa una secuencia

derivada de un dominio de gen J de inmunoglobulina y es GTLVTVSS (SEQ ID NO: 13).

5 9. Una célula huésped bacteriana que comprende un fago filamentoso según la reivindicación 3, donde dicha proteína funcional es opcionalmente capaz de ser recuperada de un cultivo medio de dicha célula huésped procarionta, tal como en el que la proteína se muestra en la superficie de una partícula de fago filamentoso.

10 10. Una proteína de fusión dimérica o multimérica expresada por una célula huésped bacteriana según la reivindicación 9, que tiene actividad de unión a proteína funcional medible, opcionalmente en el que la actividad de unión de proteína medible es la proteína A de unión a receptor FcRn.

11. Una variante de exoproteína biológicamente activa de la estructura de la proteína multimérica según la reivindicación 10.

15 12. Una biblioteca de fagos de las células huésped bacterianas que comprenden un vector de fago de ácido nucleico según la reivindicación 2(ii) en la que las posiciones específicas dentro de los residuos discretos de codificación de vector o dominios dentro de la secuencia del anticuerpo son abigarrados, opcionalmente en el que dichos ácidos nucleicos codifican una secuencia de la formación de Fc con sustituciones de aminoácidos, en donde la secuencia de formación de Fc opcionalmente comprende además un dominio de unión de ligando.

20 13. La biblioteca de fagos de la reivindicación 12 en el que el dominio de unión a ligando se selecciona del grupo que consiste de un ligando de unión al receptor, un dominio extracelular del receptor, un dominio Fab de anticuerpo que comprende un dominio variable y un dominio constante, y una construcción Fv de cadena sencilla, en la que dicho dominio de unión comprende opcionalmente el secuencias de ligando que varían unos de los otros en los restos específicos dentro del dominio de unión, como en el que el dominio de unión a ligando comprende una pluralidad de diversas variaciones en regiones determinantes de complementariedad de línea germinal de la cadena pesada seleccionadas del grupo que consta de CDR 1, CDR2, y CDR3.

25 14. Un método para producir una biblioteca de anticuerpos o fragmentos de Fc en una célula huésped bacteriana según la reivindicación 9, que comprende:

- 30 a. infectar una población de células huésped con una biblioteca de vectores que comprenden el polinucleótido de la reivindicación 1 que codifican anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos fusionados a una proteína de revestimiento del fago; y
- 35 b. cultivar la población de células bajo condiciones que permiten la expresión de anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprende Fc en la superficie del fago, y
- 40 c. seleccionar el fago que presenta los anticuerpos o fragmentos de los mismos con las propiedades deseadas o mejoradas, donde las propiedades deseadas o mejoradas se seleccionan del grupo que consiste en mejorar la diana de unión, la unión a un epítipo de diana específica, afinidad de unión al receptor Fc, disminución de los sitios de glicosilación, el aumento de los sitios de glicosilación, y una mayor estabilidad térmica.

45 15. Un método de utilización de la biblioteca de fagos de la reivindicación 12 para la selección de variantes con propiedades mejoradas, opcionalmente en las que las propiedades se seleccionan del grupo que consiste en mejorar la diana de unión, la unión a un epítipo de diana específico, la afinidad de unión al receptor Fc, disminución de los sitios de glicosilación, el aumento de los sitios de glicosilación, y una mayor estabilidad térmica.

50

55

60

65

Fig. 1

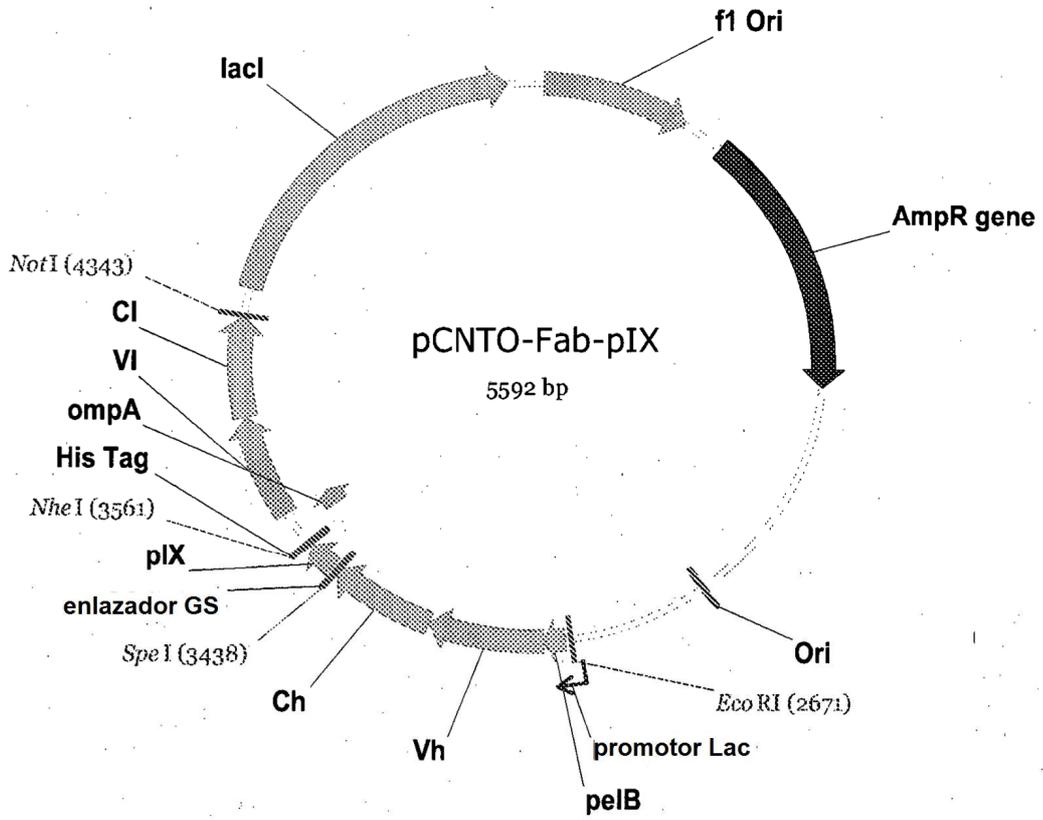
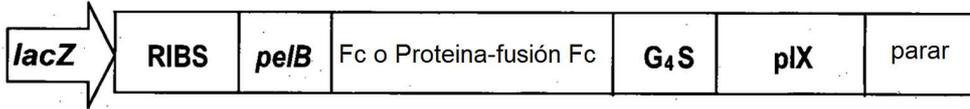


Fig. 2A-B

A



B

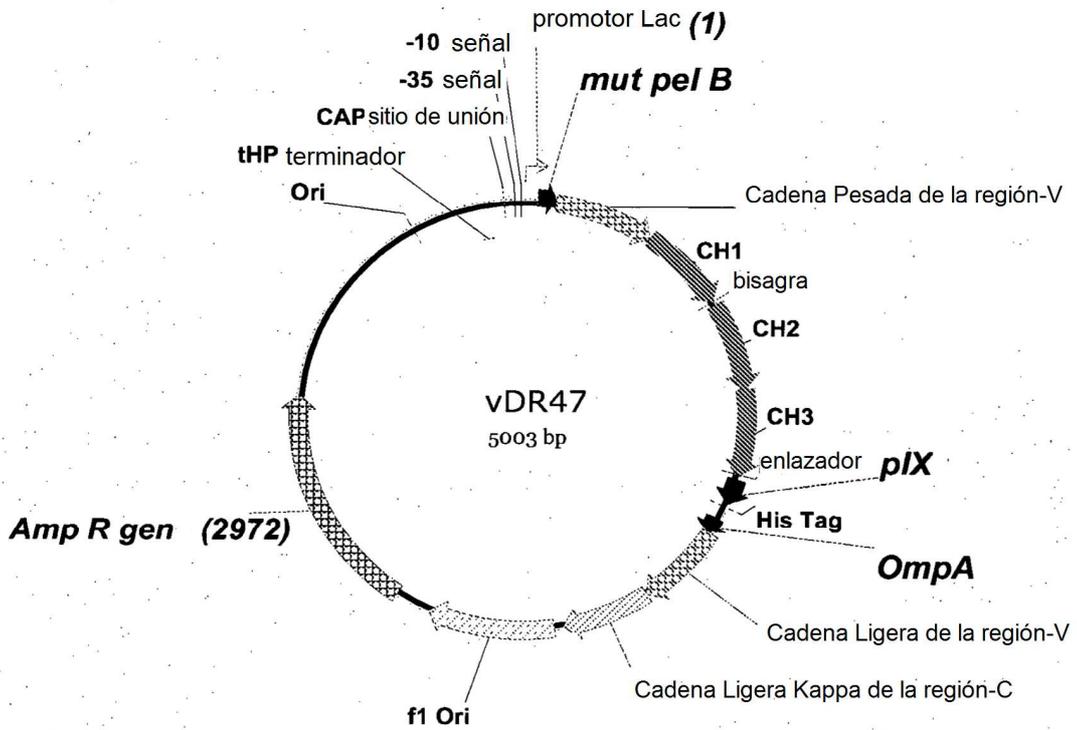


Fig. 3

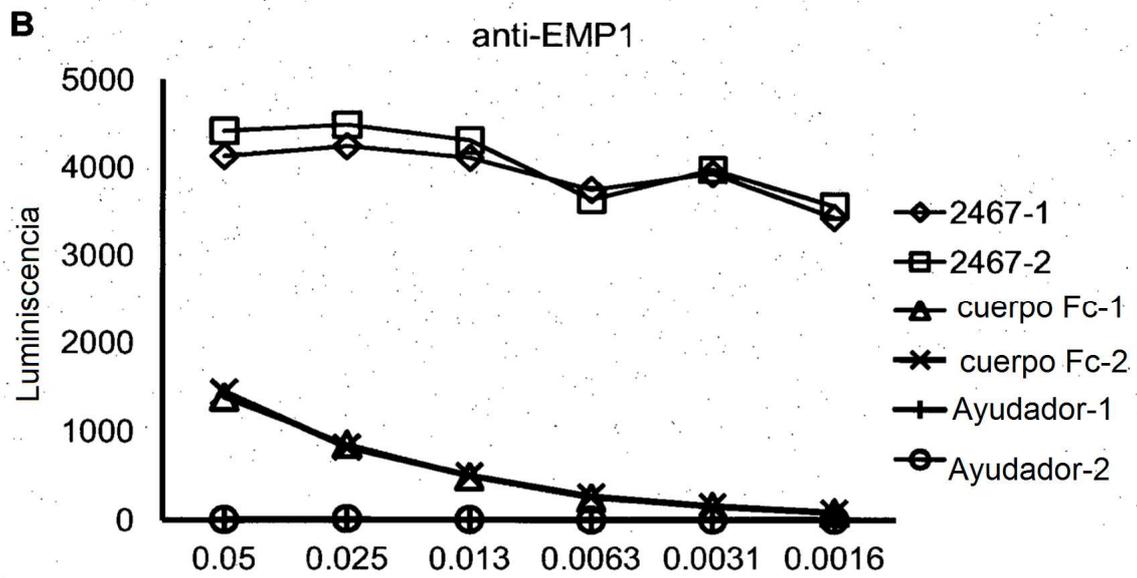
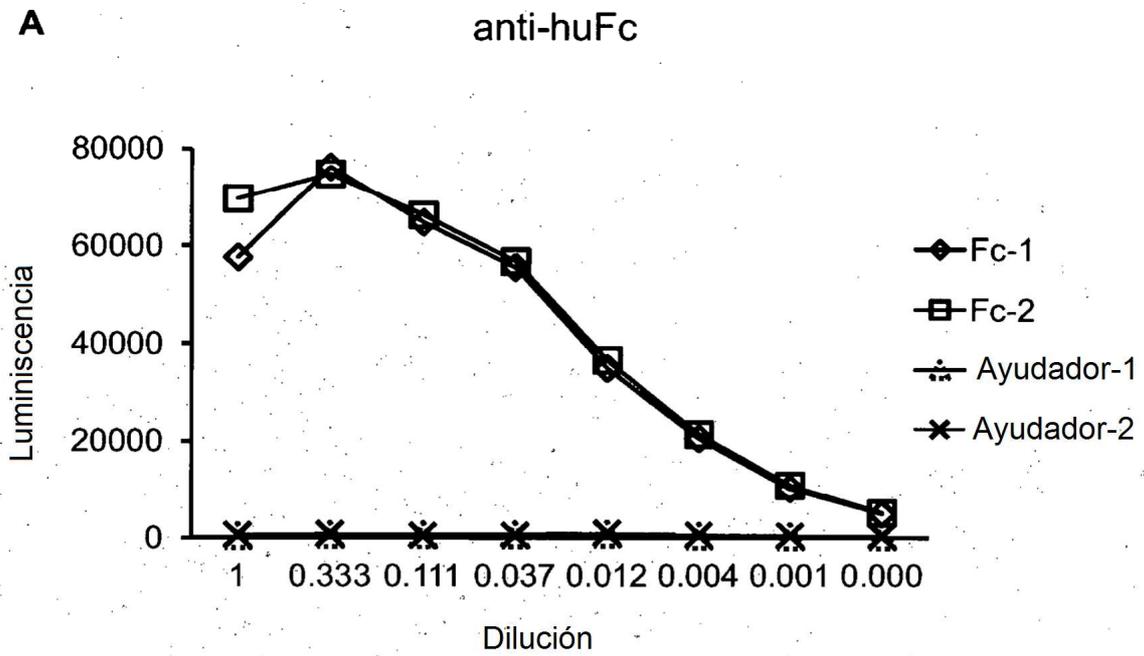


Fig. 4

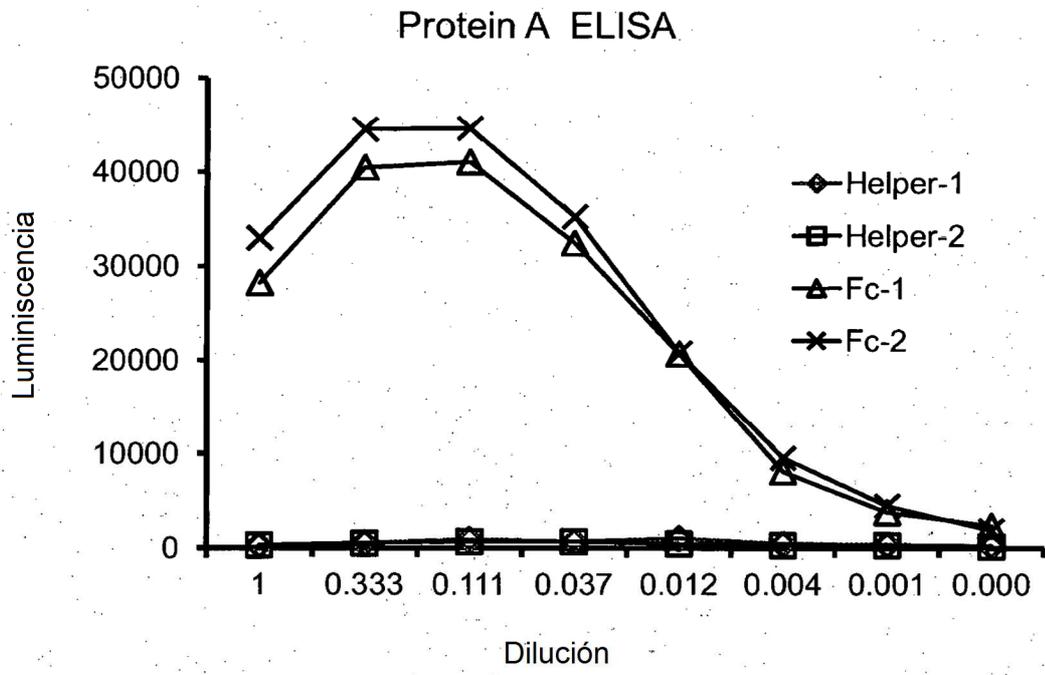


Fig. 5

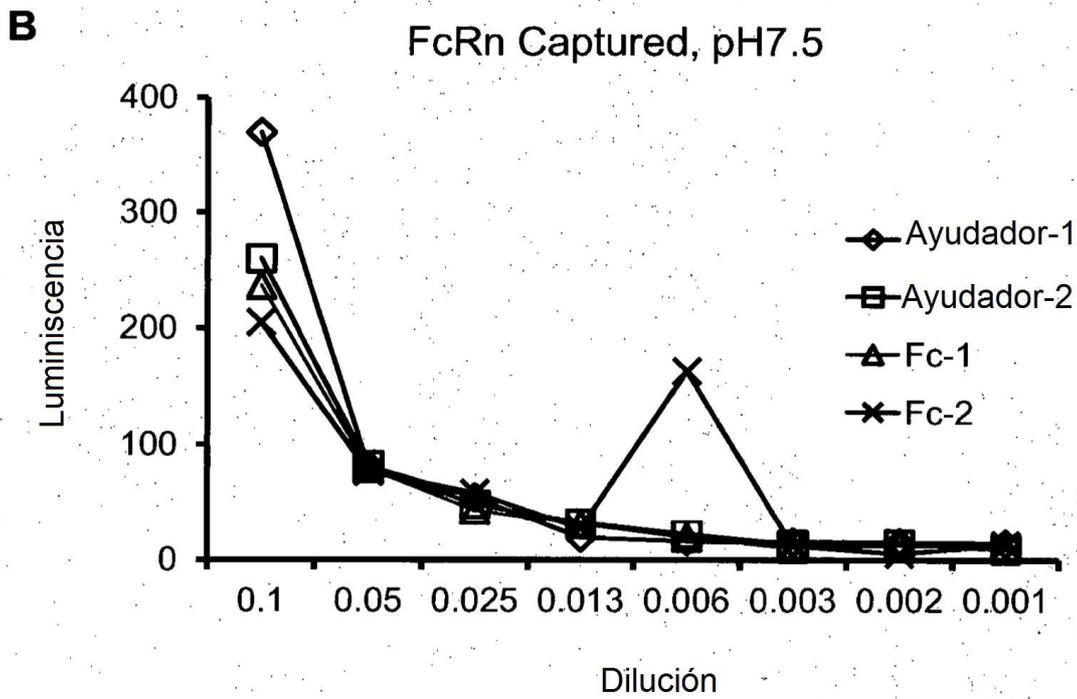
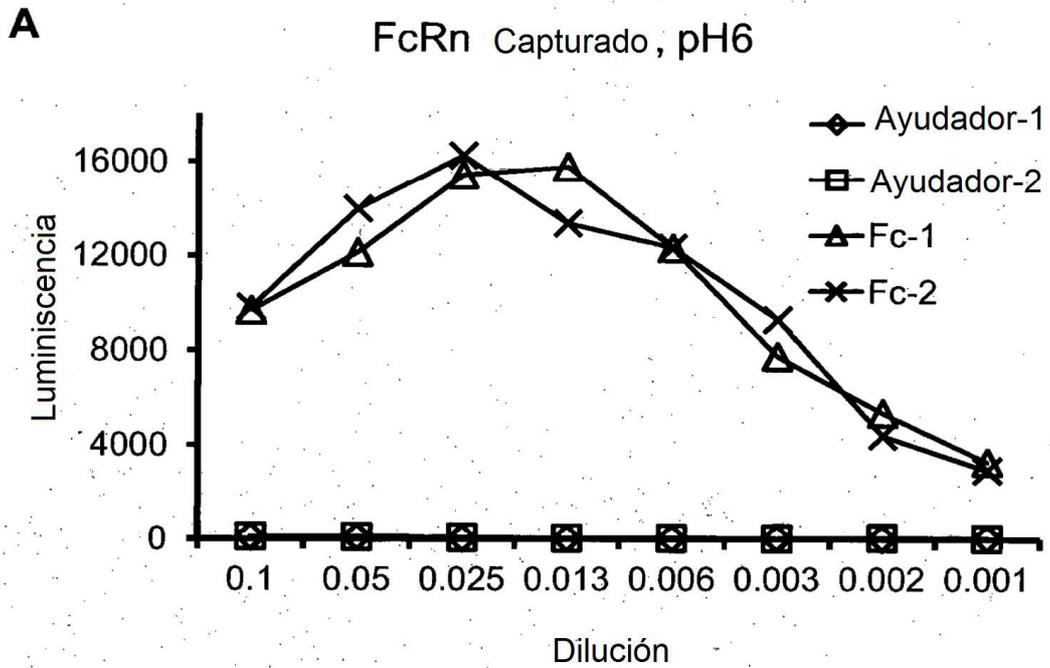


Fig. 6

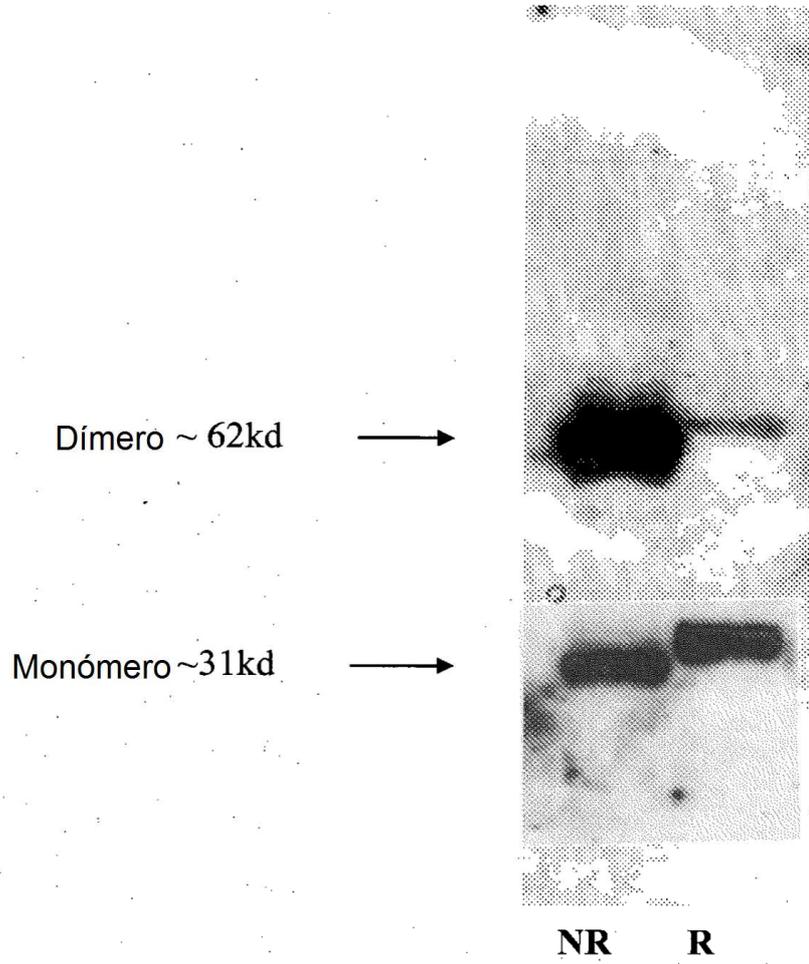


Fig. 7A

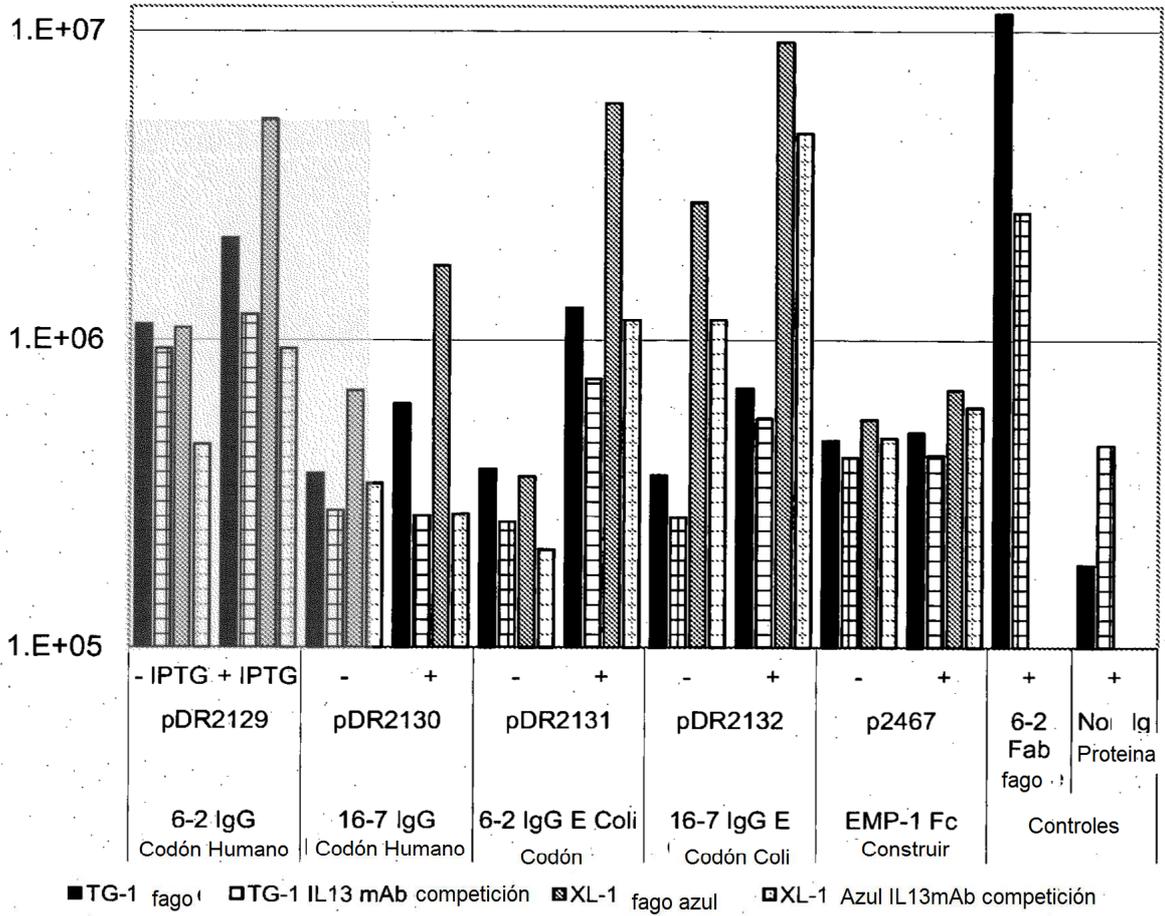


Fig. 7B

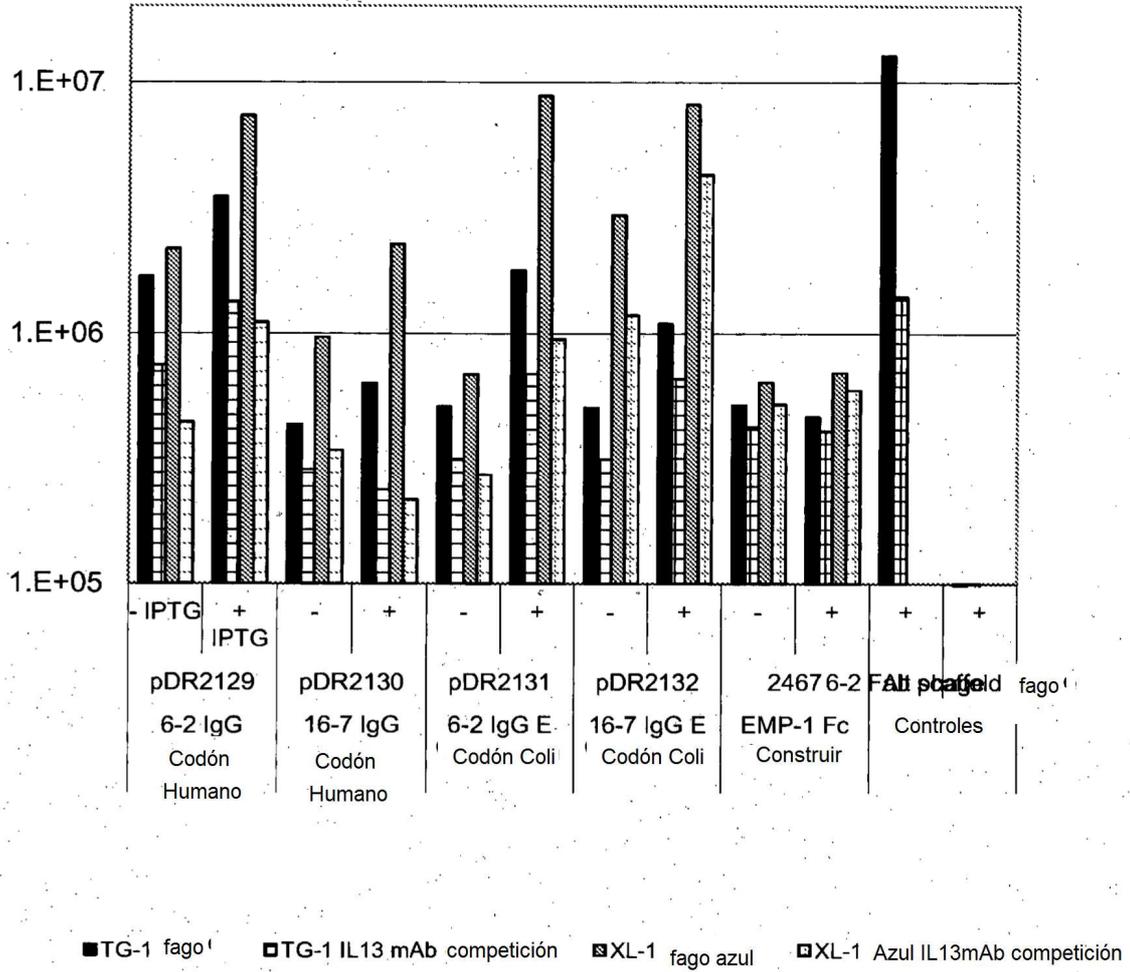


Fig. 7C

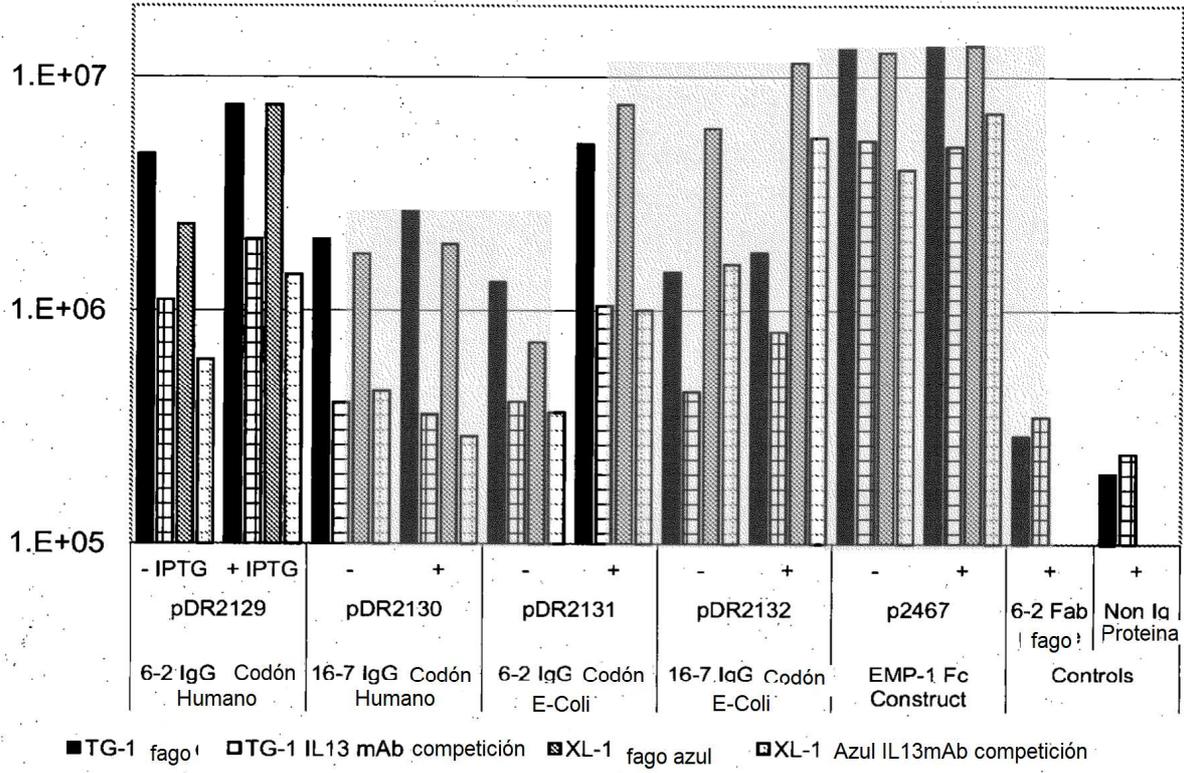


Fig. 7D

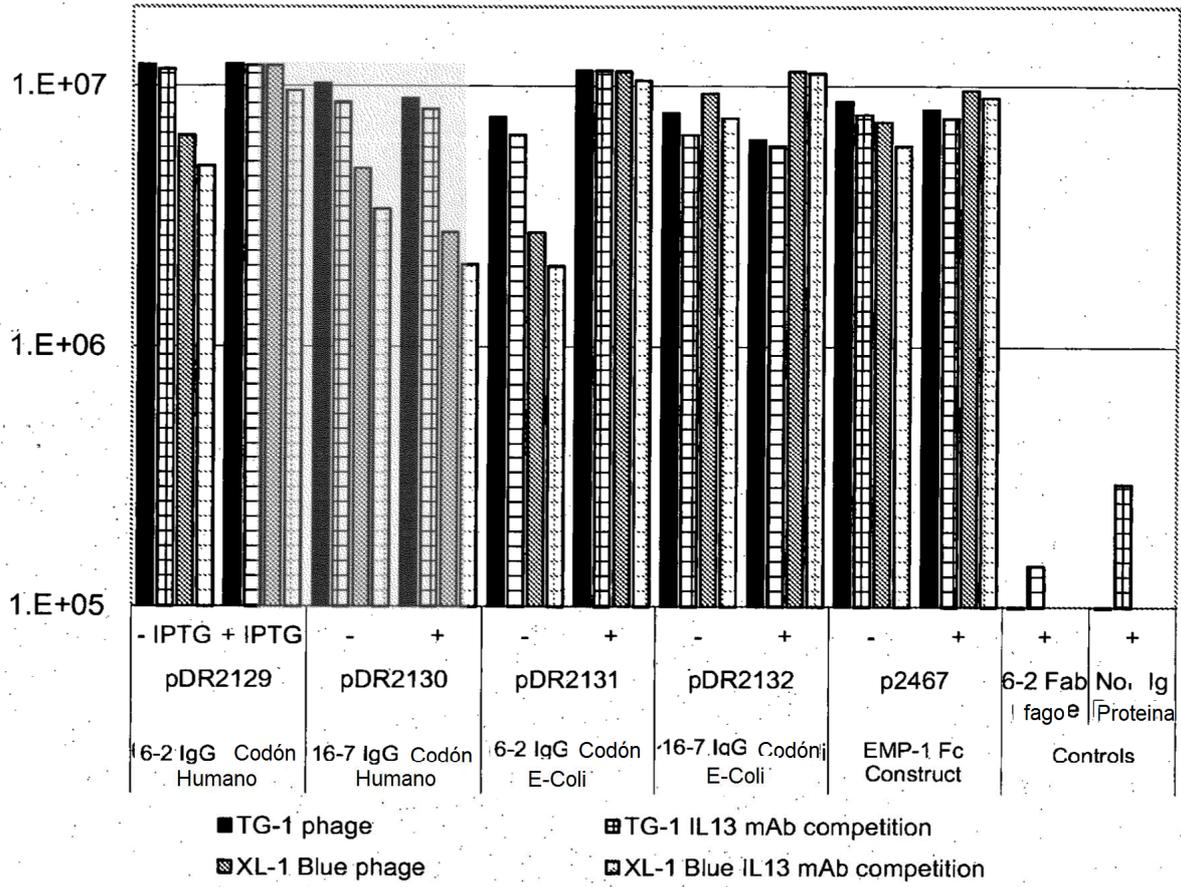


Fig. 8

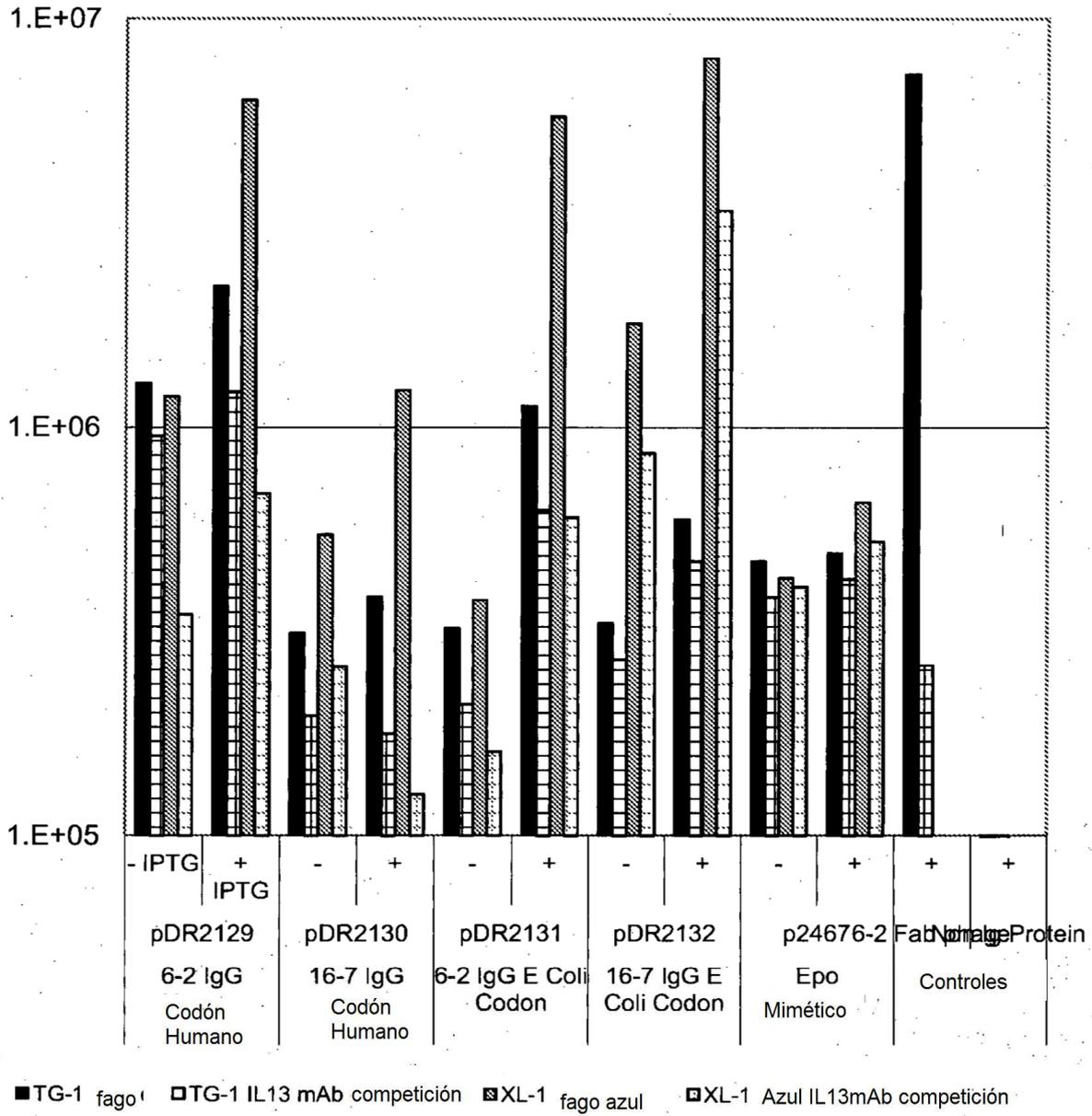


Fig. 9A

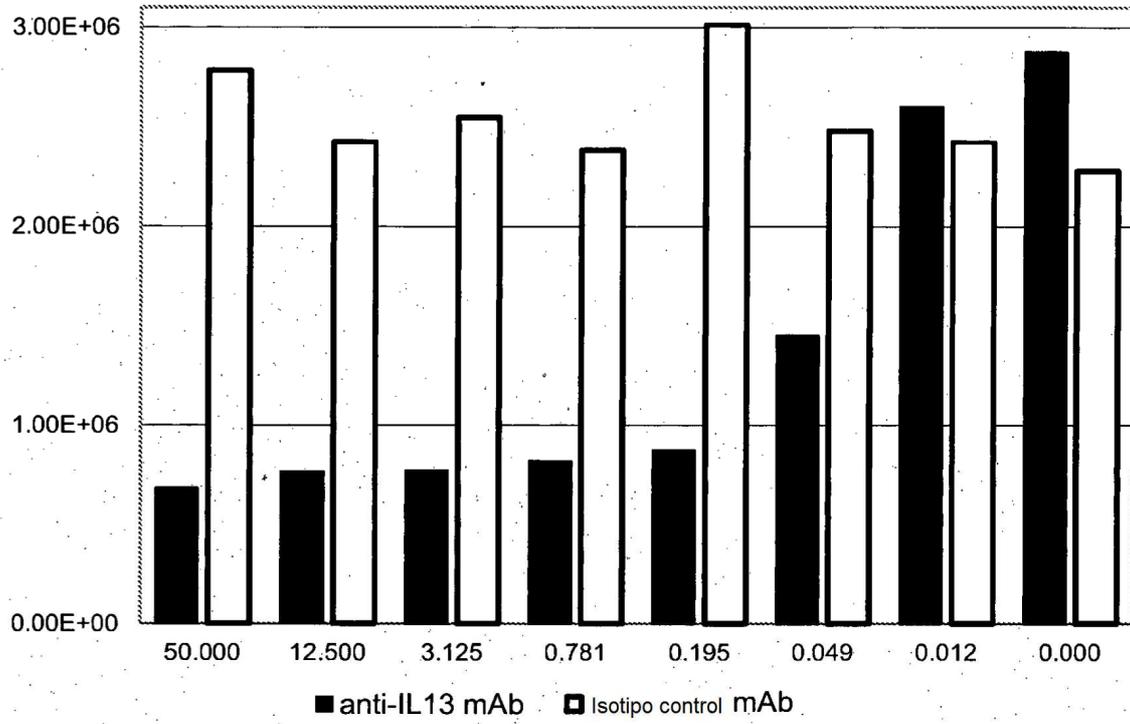


Fig. 9B

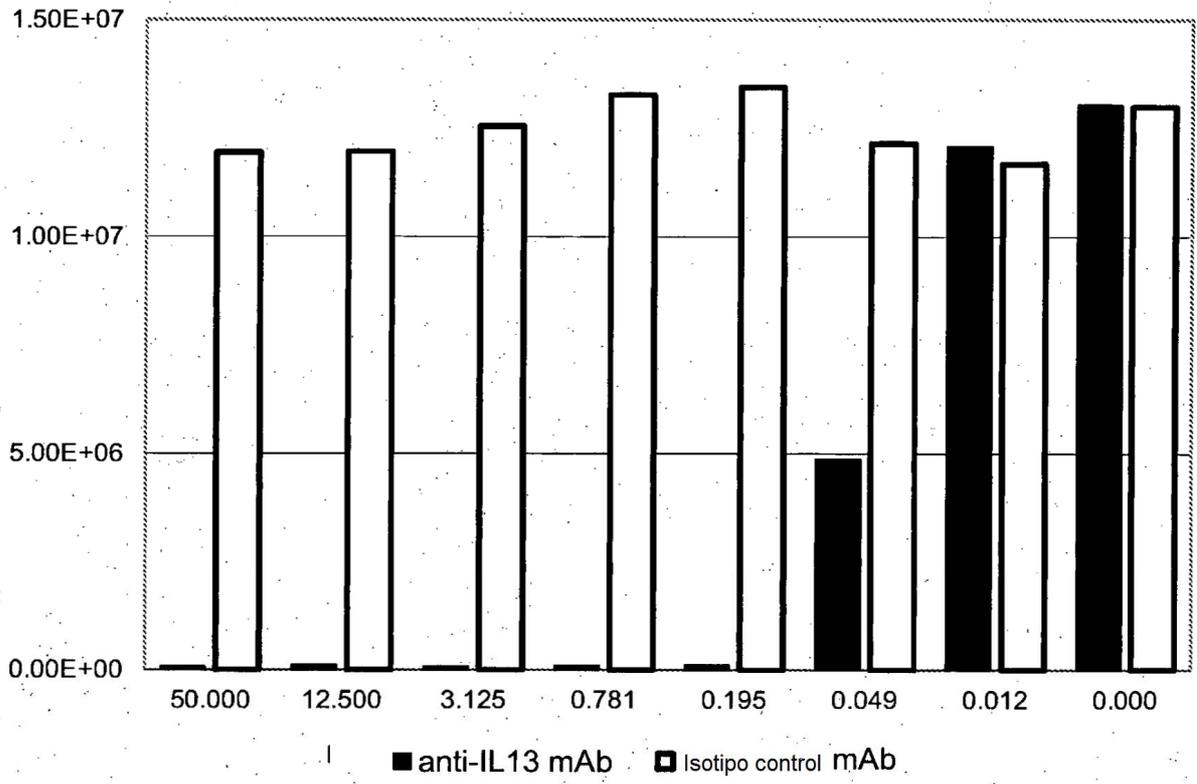


Fig. 10

