

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 999**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/EP2014/055204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14710558 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2970954**

54 Título: **Modificación de polipéptidos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313832526

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

20.02.2019

73 Titular/es:

**BICYCLERD LIMITED (100.0%)
B900, Babraham Research Campus
Cambridge CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:

**STACE, CATHERINE y
WALKER, EDWARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 700 999 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

Modificación de polipéptidos

La presente invención se refiere a métodos para la producción de ligandos polipéptidos con una actividad de unión deseada. En particular, la invención se refiere a la producción de polipéptidos que se unen covalentemente a andamiajes moleculares, de manera que se encuentran dos o más bucles peptídicos entre los puntos de unión al andamiaje. La unión del andamiaje molecular al polipéptido se lleva a cabo en una resina de purificación, que puede adoptar la forma de perlas de resina magnéticas.

Los péptidos cíclicos son capaces de unirse con elevada afinidad y especificidad de diana a dianas proteicas y por lo tanto son una clase de molécula atractiva para el desarrollo de terapéuticos. De hecho, en la clínica se utiliza con éxito varios péptidos cíclicos, tales como, por ejemplo, el péptido antibacteriano vancomicina, el fármaco inmunosupresor ciclosporina o el fármaco anticáncer octreótido (Driggers et al., *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7 (7), 608-24). Las buenas propiedades de unión resultan de una superficie de interacción relativamente grande formada entre el péptido y la diana, así como de la flexibilidad conformacional reducida de las estructuras cíclicas. Típicamente, los macrociclos se unen a superficies de varios cientos de angstroms cuadrados, tal como, por ejemplo, el antagonista cíclico CVX15 del péptido cíclico CXCR4 (400 Å²; Wu B. et al., *Science* 330 (6007), 1066-71), un péptido cíclico con el motivo Arg-Gly-Asp de unión a la integrina αVβ3 (355 Å²) (Xiong J. P. et al., *Science* 2002, 296 (5565), 151-5) o el inhibidor de péptido cíclico upaína-1 de unión al activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (603 Å²; Zhao, G., et al., *J. Struct. Biol.* 2007, 160 (1), 1-10).

Debido a su configuración cíclica, los macrociclos peptídicos son menos flexibles que los péptidos lineales, conduciendo a una pérdida más pequeña de entropía con la unión a dianas y resultando en una afinidad de unión más elevada. La flexibilidad reducida también conduce al bloqueo de conformaciones específicas de diana, incrementando la especificidad de unión en comparación con los péptidos lineales. Este efecto ha sido ejemplificado por un inhibidor potente y selectivo de la metaloproteinasa de matriz 8 (MMP-8), que pierde su selectividad respecto a otras MMP al abrir su anillo (Cherney R.J. Et al., *J. Med. Chem.* 1998, 41 (11), 1749-51). Las propiedades de unión favorables que se consiguen mediante macrociclización son todavía más pronunciadas en los péptidos multicíclicos que presentan más de un anillo peptídico, tales como, por ejemplo, vancomicina, nisina o actinomicina.

Diferentes grupos de investigación han conectado previamente polipéptidos con residuos cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp D.S. y McNamara P.E., *J. Org. Chem.*, 1985; Timmerman P. et al., *ChemBioChem.*, 2005). Muelen y colaboradores habían utilizado tris(bromometil)benzeno y moléculas relacionadas para la ciclización rápida y cuantitativa de múltiples bucles peptídicos sobre andamiajes sintéticos para la mimetización estructural de superficies de proteína (Timmerman P. et al., *ChemBioChem.*, 2005). Los métodos para la generación de compuestos fármacos candidatos, en los que dichos compuestos se generan uniendo polipéptidos que contienen cisteína a un andamiaje molecular, tal como, por ejemplo, tris(bromometil)benzeno, se describen en los documentos nº WO 2004/077062 y nº WO 2006/078161.

El documento nº WO2004/077062 describe un método de selección de un compuesto farmacológico candidato. En particular, dicho documento da a conocer diversas moléculas de andamiaje que comprenden primer y segundo grupos reactivos y poner en contacto dicho andamiaje con una molécula adicional para formar por lo menos dos enlaces entre el andamiaje y la molécula adicional en una reacción de acoplamiento.

El documento nº WO2006/078161 describe compuestos de unión, compuestos inmunogénicos y peptidomiméticos. Este documento describe la síntesis artificial de diversas colecciones de péptidos obtenidas de proteínas existentes. A continuación, estos péptidos se combinan con un péptido sintético constante en el que se han introducido algunos cambios de aminoácidos con el fin de producir bibliotecas combinatoriales. Mediante la introducción de esta diversidad mediante el enlace químico a péptidos separados que muestran diversos cambios de aminoácidos, se consigue una mayor oportunidad de encontrar la actividad de unión deseada. La figura 1 de este documento muestra una representación esquemática de la síntesis de diversos constructos de péptidos de bucle. Los constructos descritos en este documento se basan en péptidos funcionalizados con -SH, que típicamente comprenden residuos de cisteína y grupos heteroaromáticos en el andamiaje, típicamente que comprenden sustituyentes de halógeno bencílico, tales como bis- o tris-bromofenilbenzeno. Tales grupos reaccionan para formar un enlace tioéter entre el péptido y el andamiaje.

Heinis et al. recientemente han desarrollado un enfoque combinatorial basado en la presentación en fagos para generar y cribar grandes bibliotecas de péptidos bicíclicos para dianas de interés (Heinis et al., *Nat. Chem. Biol.* 5(7):502-7, 2009; ver también la solicitud de patente internacional nº WO2009/098450). Brevemente, se expresaron sobre fagos bibliotecas combinatoriales de péptidos lineales que contenían tres residuos de cisteína y dos regiones de seis aminoácidos aleatorios (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) y se ciclizaron mediante la unión covalente de las cadenas laterales de cisteína a una molécula pequeña (tris-(bromometil)benzeno). Los péptidos bicíclicos aislados en seleccionados de afinidad a las proteasas humanas cathepsina-G y calicreína plasmática (PK, por sus siglas en inglés) presentaban constantes inhibitorias nanomolares. El mejor inhibidor, PK15, inhibe la PK humana (PKh) con una K_i de 3 nM. Las similitudes en las secuencias de aminoácidos de varios péptidos bicíclicos aislados sugieren que ambos bucles peptídicos contribuyen a la unión. PK15 no inhibió la PK de rata (identidad de secuencia de 81%) ni el factor

XIa de serina proteasa humana homóloga (XIah: identidad de secuencia de 69%) o la trombina (identidad de secuencia de 36%) a la concentración más alta sometida a ensayo (10 μ M) (Heinis et al., Nat. Chem. Biol. 5(7):502-7, 2009). Este resultado sugiere que el inhibidor bicíclico posee una elevada afinidad para su diana y es altamente específico.

- 5 Aunque el método descrito por Heinis et al. resulta eficaz para la modificación de ligandos polipeptídicos presentados para producir péptidos bicíclicos, su eficiencia es muy baja. Por ejemplo, se generaron fagos infectivos a una tasa de sólo 1 por cada 350 partículas fágicas iniciales. Por lo tanto, los presentes inventores desarrollaron un protocolo mejorado para la modificación de ligandos polipeptídicos presentados sobre sistemas de expresión genética.

Compendio de la invención

- 10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de conjugación de un péptido presentado sobre un sistema de expresión genética con un andamiaje molecular, que comprende las etapas de:

- (a) combinar polipéptidos presentados sobre un sistema de expresión genética con una resina de purificación de manera que el sistema de expresión se encuentra unido a la resina, y tratar con un agente reductor el sistema de expresión unido,
- (b) exponer el sistema de expresión unido al andamiaje molecular,
- 15 (c) eliminar el andamiaje molecular no reaccionado del sistema de expresión unido, y
- (d) eluir el sistema de expresión de la resina de purificación.

- El método original de Heinis et al. Lleva a cabo la conjugación del péptido y andamiaje molecular (TBMB) libre en solución. A continuación, se aislaron mediante centrifugación los fagos portadores de péptidos que se encontraban (o no) conjugados con el andamiaje de TBMB. Los presentes inventores obtuvieron resultados mejorados mediante la conjugación del fago a una resina de purificación de fase sólida, que seguidamente puede utilizarse para aislar el fago. Por ejemplo, la resina puede aislarse mediante centrifugación o conservarse en columnas; en una realización preferente, la resina es magnética y puede aislarse mediante la aplicación de un campo magnético.
- 20

- Heinis et al. obtuvieron mejores resultados para la conjugación de péptido y andamiaje molecular (TBMB) utilizando fagos libres de disulfuros. Utilizando las técnicas proporcionadas en la presente memoria, los presentes inventores obtuvieron resultados mejorados, superando los resultados obtenidos por Heinis et al., mediante la conjugación del polipéptido con la proteína de cubierta pIII de tipo silvestre, de manera que se expresa sobre una partícula fágica.
- 25

- Aunque pIII de tipo silvestre está sujeto a degradación de los enlaces disulfuros por el agente reductor utilizado en el procedimiento para acoplar el andamiaje molecular al polipéptido, los presentes inventores han encontrado que la infectividad incrementada del fago portador de pIII de tipo silvestre respecto al fago sin disulfuros más que compensa cualquier pérdida de actividad resultante de la degradación de los enlaces disulfuro.
- 30

Preferiblemente, el polipéptido se expresa mediante fusión con la proteína pIII del fago fd, tal como el fago fdtet.

El sistema de expresión genética es la presentación en fagos. En ejemplos de la exposición, el sistema de expresión genética puede seleccionarse de la expresión ribosómica, la expresión de ARNm, la expresión en levadura y la expresión bacteriana. En una realización, el sistema de expresión genética es la presentación en fagos.

- 35 En una realización, después de la etapa (a) le sigue una etapa de lavado antes de la adición del andamiaje molecular. El lavado puede llevarse a cabo, por ejemplo, con una solución de un agente reductor, por ejemplo el agente reductor utilizado en la etapa (a). Ventajosamente, el agente reductor utilizado en la etapa de lavado es menos potente o más diluido que el agente reductor utilizado en la etapa (a).

- 40 El agente reductor utilizado en la etapa (a) preferiblemente se incluye a una concentración inferior a 500 mM, preferiblemente inferior a 200 mM, ventajosamente inferior a 100 mM. Por ejemplo, el agente reductor está presente a una concentración de 10 mM o inferior, tal como 1 mM.

El agente reductor en la etapa (b) preferentemente se incluye a una concentración inferior a 500 μ M, preferiblemente inferior a 200 μ M, ventajosamente inferior a 100 μ M. Por ejemplo, el agente reductor está presente a una concentración de 10 μ M o inferior, tal como 1 μ M.

- 45 Los polipéptidos unidos a resina pueden estar expuestos al agente reductor en forma purificada, o pueden estar presentes en cultivo. Los sistemas de expresión genética implican la replicación en células, tales como bacterias o levaduras; estas células pueden eliminarse mediante purificación, en cuyo caso la etapa (a) puede comprender una etapa de lavado, en la que los polipéptidos unidos a la resina se lavan en tampón y se separan de los contaminantes del cultivo celular.

- 50 Un agente reductor adecuado es TCEP. Pueden utilizarse otros agentes reductores, tales como DTT, tal como se indica en la presente memoria.

Las reacciones de reducción y conjugación preferiblemente se llevan a cabo a temperatura ambiente, tal como 25°C. En algunas realizaciones, la reacción de conjugación puede llevarse a cabo a 30°C. En el método anteriormente mencionado de Heinis et al., las reacciones se llevan a cabo a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, por ejemplo a 42°C.

- 5 Las reacciones de reducción y conjugación se llevan a cabo ventajosamente durante un periodo de tiempo inferior a una hora. Por ejemplo, las reacciones pueden llevarse a cabo durante 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos o 10 minutos.

10 El polipéptido preferiblemente es un polipéptido que comprende por lo menos tres grupos reactivos, separados por como mínimo dos secuencias que puedan formar los «bucles» del polipéptido una vez conjugados con el andamiaje molecular. Los bucles pueden ser de cualquier longitud adecuada, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más aminoácidos de longitud. Los bucles pueden ser de la misma o diferente longitud. Preferiblemente, se proporcionan por lo menos dos bucles. En algunas realizaciones, pueden estar presentes tres, cuatro, cinco, seis o más bucles.

Grupos reactivos en el polipéptido son capaces de formar enlaces covalentes con el andamiaje. Lo más habitual es que los grupos reactivos comprendan residuos de cisteína.

- 15 Los péptidos se combinan con una resina de purificación, que puede ser cualquier resina adecuada que resulte útil como fase sólida para la purificación de material proteico. Muchas resinas, tales como las resinas de intercambio iónico, incluyendo perlas y materiales de cromatografía es conocido de la técnica que resultan útiles con este propósito.

En una realización ventajosa, la resina es una resina magnética que permite la separación magnética de los polipéptidos unidos al sistema de expresión genética.

- 20 El andamiaje puede ser cualquier estructura que proporcione múltiples puntos de unión para los grupos reactivos del polipéptido. Se describen posteriormente andamiajes ejemplares. Las moléculas de andamiaje se conjugan con el polipéptido, mientras que los polipéptidos se incorporan en el sistema de expresión genética de manera que el sistema de expresión genética expresa el ligando polipéptido, incluyendo el andamiaje molecular. Se elimina el exceso de andamiaje.

- 25 Tras conjugarse el andamiaje con los polipéptidos, los sistemas de expresión genética que incorporan los ligandos polipeptídicos se eluyen de la resina. A continuación, los polipéptidos pueden expresarse sobre el sistema de expresión genética en forma conjugada y seleccionarse por medios conocidos.

30 En realizaciones, los ligandos polipeptídicos son multiespecíficos. En una primera configuración, por ejemplo, los bucles polipeptídicos formados por la interacción del polipéptido con el andamiaje molecular son capaces de unirse a más de una diana. En esta configuración, en una realización los bucles pueden seleccionarse individualmente para la unión a las dianas deseadas y después combinarse. En otra realización, los bucles se seleccionan juntos, como parte de una única estructura, para la unión a diferentes dianas deseadas.

35 En una segunda configuración, un grupo funcional puede unirse al extremo N- o C-terminal, o ambos, del polipéptido. El grupo funcional puede adoptar la forma de un grupo de unión, tal como un polipéptido, incluyendo un dominio de anticuerpo, un dominio Fc o un péptido estructurado adicional tal como se ha indicado anteriormente, capaz de unirse a una diana. Puede adoptar además la forma de un grupo reactivo, capaz de unión química con una diana. Además, puede ser un grupo efector, incluyendo proteínas plasmáticas grandes, tales como albúmina sérica y un péptido que penetra en la célula.

- 40 En una tercera configuración, puede unirse un grupo funcional al andamiaje molecular mismo. Los ejemplos de grupos funcionales son como los de la configuración anterior.

En realizaciones adicionales, el ligando polipéptido comprende un polipéptido unido a un andamiaje molecular en n puntos de unión, en donde dicho polipéptido se cicliza y forma n bucles separados entre dichos n puntos de unión en el andamiaje molecular, en donde 'n' es igual o superior a 2.

- 45 El polipéptido preferentemente se cicliza mediante fusión N- a C-terminal y puede ciclizarse antes o después de la unión al andamiaje molecular. Resulta preferente la unión antes de la ciclización.

Se conocen de la técnica varios métodos para la ciclización de péptidos. Por ejemplo, el polipéptido se cicliza mediante entrecruzamiento N-C utilizando un agente entrecruzante, tal como EDC.

- 50 En otra realización, el péptido puede diseñarse para comprender un aminoácido derivatizado N^α o C^α protegido y ciclizarse mediante desprotección del aminoácido derivatizado N^α o C^α protegido para acoplar dichos aminoácidos con el extremo opuesto del polipéptido.

En una realización preferente, el polipéptido se cicliza por medios enzimáticos.

Por ejemplo, el enzima es una transglutaminasa, por ejemplo una transglutaminasa microbiana, tal como transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis*. Con el fin de aprovechar la ciclización enzimática, puede resultar

necesario incorporar una secuencia de sustrato N- y/o C-terminal para el enzima en el polipéptido. Algunas o todas las secuencias de sustrato pueden eliminarse durante la reacción enzimática, es decir, el polipéptido ciclizado puede no comprender las secuencias de sustrato en su configuración final.

5 En una realización todavía adicional, los ligandos polipéptidos según la invención son específicos de la calicreína humana y comprenden un polipéptido que comprende por lo menos tres grupos reactivos, separados por como mínimo dos secuencias de bucle y un andamiaje molecular que forma enlaces covalentes con los grupos reactivos del polipéptido de manera que se forman por lo menos dos bucles polipeptídicos en el andamiaje molecular, en donde los bucles del ligando péptido comprenden tres, cuatro o cinco, aunque menos de seis, aminoácidos.

10 Inesperadamente, los presentes inventores han encontrado que los péptidos que comprenden menos de 6 aminoácidos en cada bucle pueden presentar una afinidad de unión mucho más alta para la calicreína.

En una realización, los bucles del ligando péptido comprenden tres aminoácidos y el polipéptido presenta la secuencia de consenso $G_r FxxG_r RVxG_r$, en donde G_r es un grupo reactivo.

15 En otra realización, los bucles del ligando péptido comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende la secuencia de consenso $G_r GGxxNG_r$, en donde G_r es un grupo reactivo.

Por ejemplo, dos bucles contiguos del polipéptido pueden comprender la secuencia de consenso $G_r GGxxNG_r RxxxxG_r$.

20 En una realización, los bucles del ligando péptido comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende el motivo $G_r x^W/FPx^K/RG_r$, en donde G_r es un grupo reactivo. En el presente contexto, la referencia a un «primer» bucle no indica necesariamente una posición particular del bucle en una secuencia. En algunas realizaciones, sin embargo, el primer bucle puede ser un bucle proximal en una secuencia peptídica entre un extremo aminoterminal y un extremo carboxiterminal. Por ejemplo, el polipéptido comprende además un segundo bucle distal que comprende el motivo $G_r^T/LH^Q/TxLG_r$. Entre los ejemplos de secuencias del primer bucle se incluyen $G_r xWPARG_r$, $G_r xWPSRG_r$, $G_r xFPFRG_r$ y $G_r xFPYRG_r$. En estos ejemplos, x puede ser cualquier aminoácido, aunque es, por ejemplo, S o R.

25 En una realización, los bucles del ligando péptido comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende el motivo $G_r xHxDLG_r$, en donde G_r es un grupo reactivo.

En una realización, los bucles del ligando péptido comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende el motivo $G_r THxxLG_r$, en donde G_r es un grupo reactivo.

En una realización, el polipéptido comprende dos bucles contiguos que comprenden el motivo $G_r x^W/FPx^K/RG_r^T/LH^Q/TDLG_r$.

30 En los ejemplos en la presente memoria, la numeración se refiere a las posiciones en los bucles e ignora los grupos reactivos. De esta manera, en $G_r x^W/FPx^K/RG_r^T/LH^Q/TDLG_r$, x está en la posición 1 y T/L está en la posición 6.

En las realizaciones anteriores, el grupo reactivo preferentemente es un aminoácido reactivo. Preferiblemente, el aminoácido reactivo es cisteína.

35 Pueden prepararse variantes de los polipéptidos según este aspecto de la invención tal como se ha descrito anteriormente, mediante la identificación de aquellos residuos que se encuentran disponibles para la mutación y preparando bibliotecas que incluyen mutaciones en esas posiciones.

En un aspecto adicional, se proporciona un ligando polipéptido según el aspecto anterior de la invención, que comprende uno o más sustituyentes aminoácidos no naturales y es resistente a la degradación por proteasas.

40 Los presentes inventores han encontrado que determinados aminoácidos no naturales permiten la unión a la calicreína plasmática con K_i nM, incrementando simultáneamente el tiempo de residencia en el plasma de manera significativa.

En una realización, el aminoácido no natural se selecciona de N-metil-arginina, homoarginina e hidroxiprolina. Preferiblemente, se utilizan derivados N-metilo y homoderivados de la arginina para sustituir la arginina, y la prolina 3 puede sustituirse preferiblemente por hidroxiprolina, ácido carboxílico azetidina, o un aminoácido alfa-sustituido, tal como ácido aminoisobutírico. En otra realización, la arginina puede sustituirse por guanidil-fenilalanina.

45 En una realización, el polipéptido comprende un primer bucle que comprende el motivo $G_r xWPARG_r$, en el que P se sustituye por ácido carboxílico azetidina, y/o R se sustituye por N-metil-arginina, y/o R se sustituye por homoarginina, y/o R se sustituye por guanidil-fenilalanina.

50 En una realización, el polipéptido comprende un primer bucle que comprende el motivo $G_r xFPYRG_r$, en el que R se sustituye por N-metil-arginina, y/o R se sustituye por homoarginina, y en donde la prolina se sustituye por ácido carboxílico azetidina, y/o R se sustituye por guanidil-fenilalanina.

En una realización, el ligando polipéptido puede comprender además un polímero de sarcosina, utilizado como conector para unir ligandos polipéptidos entre sí, o para unir uno o más grupos funcionales.

En algunas realizaciones, el ligando polipéptido puede ser resistente a proteasas. Los conjugados resistentes a proteasas pueden seleccionarse mediante el cribado de un repertorio de ligandos polipéptidos para la resistencia a proteasas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: evaluación de las condiciones de reacción para unir los péptidos presentados en fagos a tris-(bromometil)benceno (TBMB). (A) Masa molecular de la proteína de fusión GCGSGCGSGCG-D1-D2 antes y después de la reacción con TBMB 10 μ M en NH_4HCO_3 20 mM, EDTA 5 mM, pH 8, ACN al 20% a 30°C durante 1 hora determinada mediante espectrometría de masas. La diferencia de masas entre la proteína de fusión de péptido reaccionada y la no reaccionada corresponde a la masa de la molécula pequeña nuclear mesitileno. (C) Títulos (unidades de transducción) de fago reducido y tratado con diversas concentraciones de TBMB en NH_4HCO_3 20 mM, EDTA 5 mM, pH 8, ACN al 20% a 30°C durante 1 hora. Se muestran los títulos de fago de fdg3p0ss21 (negro) y de la biblioteca 1 (blanco).

Figura 2: reacción química del compuesto trifuncional TBMB con péptidos que contienen una o dos cisteínas. (A) Mecanismo plausible de reacción de TBMB con una proteína de fusión de péptido que contiene dos residuos de cisteína. (B) Espectros de masas de proteínas de fusión de péptidos con dos cisteínas antes y después de la reacción con TBMB. (C) Mecanismo plausible de reacción de TBMB con una proteína de fusión de péptido que contiene un residuo de cisteína. (D) Espectros de masas de proteínas de fusión de péptidos con una cisteína, antes y después de la reacción con TBMB.

Figura 3: se ilustra la unión a calicreína de ligandos polipéptidos modificados procesados en resina.

Figura 4: efecto de diferentes tampones sobre el rendimiento del procedimiento de modificación. (A) Efecto de diferentes tampones de modificación, NaHCO_3 y NH_4CO_3 . (B) Efecto de diferentes concentraciones de tampón de elución de NaCl a diferentes pH. (C) Efecto de diferentes concentraciones de tampón de elución de NaCl y pH sobre la elución en la primera y segunda etapas en un procedimiento de elución en dos etapas.

Figura 5: ensayo de unión a diana de los eluidos de diferentes muestras tratadas con diferentes tampones y eluidos a diferente pH.

Figura 6: ilustración de protocolos de modificación magnética rápida y prolongada.

Figura 7: comparación entre los protocolos rápido y prolongado para la modificación de fagos portadores de PK15: (A) comparación de los títulos de fagos mediante qPCR, y (B) comparación funcional para la unión de calicreína.

Figura 8: gráfico de barras que muestra el título total de fagos, de comparación entre fagos de tipo silvestre y de Schmid.

Figura 9: número de partículas fágicas por ml (A) y total (B) durante la preparación y modificación de los fagos, de comparación entre fagos de tipo silvestre y de Schmid. En los gráficos, las columnas a la izquierda con PK15, seguido de PEP48 WT, con PEP 48 Schmid a la derecha.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado entendido comúnmente por el experto ordinario en la materia, tal como en la técnica química de péptidos, el cultivo celular y la presentación en fagos, y la química y bioquímica de los ácidos nucleicos. Se utilizan técnicas estándares para métodos de biología molecular, genética y bioquímica (véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4a ed., John Wiley & Sons, Inc.).

Un ligando (poli)péptido o conjugado de (poli)péptidos, tal como se denomina en la presente memoria, se refiere a un polipéptido unido covalentemente a un andamiaje molecular. Típicamente, tales polipéptidos comprenden dos o más grupos reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes con el andamiaje, y una secuencia entre dichos grupos reactivos que se denomina secuencia de bucle, ya que forma un bucle cuando el péptido está unido al andamiaje. En el presente caso, los polipéptidos comprenden por lo menos tres grupos reactivos y forman por lo menos dos bucles en el andamiaje.

Los grupos reactivos son grupos capaces de formar un enlace covalente con el andamiaje molecular. Típicamente, los grupos reactivos se encuentran presentes en cadenas laterales de aminoácidos en el péptido. Son ejemplos los grupos que contienen amino, tales como cisteína, lisina y selenocisteína.

Específicamente, en el contexto de la presente memoria, se refiere a la capacidad de un ligando de unirse o, de otro modo, interactuar con su diana afín excluyendo entidades que son similares a la diana. Por ejemplo, la especificidad

5 puede referirse a la capacidad de un ligando de inhibir la interacción de un enzima humano, pero no un enzima homólogo de una especie diferente. Utilizando el enfoque descrito en la presente memoria, la especificidad puede modularse, es decir, incrementarse o reducirse, de manera que los ligandos sean más o menos capaces de interactuar con homólogos parálogos de la diana deseada. No se pretende que la especificidad sea sinónima de actividad, afinidad o avidéz, y la potencia de la acción de un ligando sobre su diana (tal como, por ejemplo, la afinidad de unión o el nivel de inhibición) no están necesariamente relacionados con su especificidad.

La actividad de unión, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las mediciones cuantitativas de unión obtenidas de ensayos de unión, por ejemplo tal como se describe en la presente memoria. Por tanto, la actividad de unión se refiere a la cantidad de ligando péptido que está unido a una concentración dada de diana.

10 La multiespecificidad es la capacidad de unirse a dos o más dianas. Típicamente, los péptidos de unión son capaces de unirse a una única diana, tal como un epítipo en el caso de un anticuerpo, debido a sus propiedades conformacionales. Sin embargo, pueden desarrollarse péptidos que pueden unirse a dos o más dianas; por ejemplo anticuerpos específicos duales. En la presente invención, los ligandos péptidos pueden ser capaces de unirse a dos o más dianas y por tanto son multiespecíficos. Preferiblemente, se unen a dos dianas y son específicos duales. La unión puede ser independiente, lo que significaría que los sitios de unión para las dianas en el péptido no resultan impedidas estructuralmente por la unión de una u otra de las dianas. En este caso, ambas dianas pueden unirse independientemente. Más generalmente, se espera que la unión de una diana impedirá por lo menos parcialmente la unión de la otra.

20 Una diana es una molécula o parte de la misma a la que se unen, o de otro modo, con la que interactúan, los ligandos péptidos. Aunque la unión se percibe como un requisito previo para la actividad de la mayoría de tipos, y puede ser una actividad en sí misma, se encuentran contempladas otras actividades. De esta manera, la presente invención no requiere la medición de la unión directa o indirectamente.

25 El andamiaje molecular es cualquier molécula que es capaz de conectarse al péptido en múltiples puntos para proporcionar una o más características estructurales al péptido. No es un entrecruzante, en el aspecto de que no sustituye meramente un enlace disulfuro; por el contrario, proporciona dos o más puntos de unión para el péptido. Preferiblemente, el andamiaje molecular comprende por lo menos tres puntos de unión para el péptido, denominados grupos reactivos del andamiaje. Estos grupos son capaces de reaccionar con los grupos reactivos en el péptido para formar un enlace covalente. Las estructuras preferentes para los andamiajes moleculares se describen posteriormente.

30 El cribado para la actividad de unión (o cualquier otra actividad deseada) se lleva a cabo según métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo de la tecnología de presentación en fagos. Por ejemplo, las dianas inmovilizadas en una fase sólida pueden utilizarse para identificar y aislar los elementos que se unen de un repertorio. El cribado permite la selección de los elementos de un repertorio según características deseadas.

35 El término biblioteca se refiere a una mezcla heterogénea de polipéptidos o ácidos nucleicos. La biblioteca está compuesta de elementos que no son idénticos. En esta medida, la biblioteca es sinónima de repertorio. Las diferencias de secuencia entre elementos de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede presentar la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede presentar la forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene únicamente un elemento o un número limitado de elementos de la biblioteca.

40 En una realización, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferente, por tanto, una biblioteca puede presentar la forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un único elemento de la biblioteca en forma de ácidos nucleicos que puede expresarse para producir su elemento polipéptido correspondiente. De esta manera, la población de organismos huésped presenta el potencial de codificar un gran repertorio de variantes de polipéptido genéticamente diversas.

45 En una realización, una biblioteca de ácidos nucleicos codifica un repertorio de polipéptidos. Cada elemento ácido nucleico de la biblioteca preferiblemente presenta una secuencia relacionada con otro u otros elementos de la biblioteca. La expresión 'secuencia relacionada' se refiere a una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 50%, por ejemplo una identidad de por lo menos 60%, por ejemplo una identidad de por lo menos 70%, por ejemplo una identidad de por lo menos 80%, por ejemplo una identidad de por lo menos 90%, por ejemplo una identidad de por lo menos 95%, por ejemplo una identidad de por lo menos 98%, por ejemplo una identidad de por lo menos 99% respecto a por lo menos otro elemento de la biblioteca. La identidad puede juzgarse a lo largo de un segmento contiguo de por lo menos 3 aminoácidos, por ejemplo de por lo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, por ejemplo de por lo menos 12 aminoácidos, por ejemplo de por lo menos 14 aminoácidos, por ejemplo de por lo menos 16 aminoácidos, por ejemplo de por lo menos 17 aminoácidos o la longitud completa de la secuencia de referencia.

Un repertorio es una colección de variantes, en este caso variantes de polipéptido, que difieren en su secuencia. Típicamente, la localización y naturaleza de los grupos reactivos no varía, aunque las secuencias que forman los

bucles pueden estar aleatorizadas entre ellas. Los repertorios difieren de tamaño pero debe considerarse que comprenden por lo menos 10^2 elementos. Pueden construirse repertorios de 10^{11} o más elementos.

5 Un juego de ligandos polipéptidos, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una pluralidad de ligandos polipéptidos que pueden someterse a selección en los métodos descritos. Potencialmente, un juego puede ser un repertorio, pero también puede ser una pequeña colección de polipéptidos, de por lo menos 2 hasta 10, 20, 50, 100 o más.

10 Un grupo de ligandos polipéptidos, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a dos o más ligandos. En una realización, un grupo de ligandos comprende únicamente ligandos que comparten por lo menos una especificidad de diana. Típicamente, un grupo consiste en por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, 20, 50, 100 o más ligandos. En una realización, un grupo consiste en 2 ligandos.

(i) Andamiaje molecular

Los andamiajes moleculares se describen en, por ejemplo, el documento n° WO2009098450 y referencias citadas en el mismo, en particular los documentos n° WO2004077062 y n° WO2006078161.

15 Tal como se indica en los documentos anteriores, el andamiaje molecular puede ser una molécula pequeña, tal como una molécula orgánica pequeña.

En una realización, el andamiaje molecular puede estar constituido por, o puede estar basado en, monómeros naturales, tales como nucleósidos, azúcares o esteroides. Por ejemplo, el andamiaje molecular puede comprender un polímero corto de tales entidades, tales como un dímero o un trímero.

20 En una realización, el andamiaje molecular es un compuesto de toxicidad conocida, por ejemplo de baja toxicidad. Entre los ejemplos de compuestos adecuados se incluyen colesterol, nucleótidos, esteroides o fármacos existentes, tales como el tamazepam.

En una realización, el andamiaje molecular puede ser una macromolécula. En una realización, el andamiaje molecular es una macromolécula compuesta de aminoácidos, nucleótidos o carbohidratos.

25 En una realización, el andamiaje molecular comprende grupos reactivos que son capaces de reaccionar con uno o más grupos funcionales del polipéptido para formar enlaces covalentes.

El andamiaje molecular puede comprender grupos químicos tales como aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, azidas, anhídridos, succinimidas, maleimidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

30 En una realización, el andamiaje molecular puede comprender o puede consistir en tris(bromometil)benceno, especialmente 1,3,5-tris(bromometil)benceno ('TBMB') o un derivado del mismo.

En una realización, el andamiaje molecular es 2,4,6-tris(bromometil)mesitileno. Es similar a 1,3,5-tris(bromometil)benceno pero contiene adicionalmente tres grupos metilo unidos al anillo benceno. Esto presenta la ventaja de que los grupos metilo adicionales pueden formar contactos adicionales con el polipéptido y por tanto añadir una restricción estructural adicional.

35 Entre otros andamiajes moleculares se incluyen 1,3,5-triacrililoil-1,3,5-triazinano (TATA), N,N',N''-(benceno-1,3,5-triil)-tris(2-bromoacetamida) (TBAB) y N,N',N''-benceno-1,3,5-triiltrisprop-2-enamida (TAAB). Véase Chen et al., ChemBioChem. 2012, 13, 1032-1038.

40 El andamiaje molecular de la invención contiene grupos químicos que permiten que los grupos funcionales del polipéptido de la biblioteca codificada de la invención formen enlaces covalentes con el andamiaje molecular. Dichos grupos químicos se seleccionan de un amplio abanico de funcionalidades, incluyendo aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, anhídridos, succinimidas, maleimidas, azidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

(ii) Polipéptido

45 Las cadenas laterales de aminoácidos naturales o no naturales pueden proporcionar los grupos reactivos de los polipéptidos. Los grupos reactivos de los polipéptidos pueden seleccionarse de grupos tiol, grupos amino, grupos carboxilo, grupos guanidinio, grupos fenólicos o grupos hidroxilo. Los grupos reactivos de los polipéptidos pueden seleccionarse de grupos azida, queto-carbonilo, alquino, vinilo o haluro de arilo. Los grupos reactivos de los polipéptidos para la unión a un andamiaje molecular pueden ser los extremos amino o carboxi del polipéptido.

50 En algunas realizaciones, cada uno de los grupos reactivos del polipéptido para la unión a un andamiaje molecular son del mismo tipo. Por ejemplo, cada grupo reactivo puede ser un residuo de cisteína. Se proporcionan detalles adicionales en el documento n° WO2009098450.

En algunas realizaciones, los grupos reactivos para la unión a un andamiaje molecular pueden comprender dos o más tipos diferentes, o pueden comprender tres o más tipos diferentes. Por ejemplo, los grupos reactivos pueden comprender dos residuos de cisteína y un residuo de lisina, o pueden comprender un residuo de cisteína, un residuo de lisina y una amina N-terminal.

5 Puede utilizarse cisteína debido a que presenta la ventaja de que su reactividad es la más diferente de todos los demás aminoácidos. Son grupos reactivos con andamiaje que podrían utilizarse en el andamiaje molecular para la reacción con grupos tiol de las cisteínas, los haluros de alquilo (también denominados halogenoalcanos o haloalcanos). Son ejemplos, el bromometilbenceno (el grupo reactivo con andamiaje ejemplificado por TBMB) o la yodoacetamida. Otros grupos reactivos con andamiaje utilizados para acoplar selectivamente compuestos con cisteínas presentes en las proteínas son las maleimidadas. Entre los ejemplos de maleimidadas que pueden utilizarse como andamiajes moleculares en la invención se incluyen tris-(2-maleimidoetil)amina, tris-(2-maleimidoetil)benceno y tris-(maleimido)benceno. La selenocisteína también es un aminoácido natural que presenta una reactividad similar con la cisteína y que puede utilizarse para las mismas reacciones. De esta manera, ahí donde se mencione cisteína, típicamente resulta aceptable sustituirla por selenocisteína, a menos que el contexto sugiera lo contrario.

15 Las lisinas (y aminas primarias del extremo N-terminal de los péptidos) también resultan adecuadas como grupos reactivos para modificar péptidos sobre los fagos mediante la unión a un andamiaje molecular. Sin embargo, son más abundantes en las proteínas fágicas que las cisteínas y existe un riesgo más alto de que las partículas fágicas puedan entrecruzarse o que pierdan su infectividad. Sin embargo, se ha encontrado que las lisinas resultan especialmente útiles en reacciones intramoleculares (p.ej., en el caso de que un andamiaje molecular ya se encuentre unido al péptido fágico) para formar un segundo enlace o enlace consecutivo con el andamiaje molecular. En este caso, el andamiaje molecular reacciona preferentemente con lisinas del péptido presentado (en particular lisinas que se encuentran en estrecha proximidad). Los grupos reactivos con andamiaje que reaccionan selectivamente con aminas primarias son las succinimidadas, aldehído o haluros de alquilo. En el grupo bromometilo que se utiliza en varios de los ejemplos adjuntos, los electrones del anillo de benceno pueden estabilizar el estado de transición catiónica. Este haluro de arilo particular, por tanto, es 100 a 1.000 veces más reactivo que los haluros de alquilo. Entre los ejemplos de succinimidadas para la utilización como andamiaje molecular se incluyen tris-(aminotriacetato de succinimidilo), ácido 1,3,5-bencenotriacético. Entre los ejemplos de aldehídos para la utilización como andamiaje molecular se incluyen el triformilmetano. Entre los ejemplos de haluros de alquilo para la utilización como andamiaje molecular se incluyen 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trimetilbenceno, 1,3,5-tris(bromometil)benceno y 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno.

Los aminoácidos con grupos reactivos para la unión a un andamiaje molecular pueden estar situados en cualesquiera posiciones adecuadas dentro del polipéptido. Con el fin de influir sobre las estructuras o bucles particulares creados, el experto en la materia podrá modificar las posiciones de los aminoácidos que presentan los grupos reactivos, p.ej. mediante manipulación del ácido nucleico codificante del polipéptido con el fin de mutar el polipéptido producido. Por tales medios puede manipularse la longitud del bucle de acuerdo con las presentes enseñanzas.

Por ejemplo, el polipéptido puede comprender la secuencia AC(X)_nC(X)_mCG, en donde X representa un aminoácido natural aleatorio, A es alanina, C es cisteína y G es glicina, y n y m, que pueden ser iguales o diferentes, son números entre 3 y 6.

(iii) Grupos reactivos del polipéptido

40 El andamiaje molecular de la invención puede unirse al polipéptido mediante grupos funcionales o reactivos en el polipéptido. Estos se forman típicamente a partir de las cadenas laterales de aminoácidos particulares presentes en el polímero polipéptido. Tales grupos reactivos pueden ser de una cadena lateral de cisteína, una cadena lateral de lisina, o un grupo amina N-terminal o cualquier otro grupo reactivo adecuado. Nuevamente, pueden encontrarse detalles en el documento nº WO2009098450.

45 Son ejemplos de grupos reactivos de aminoácidos naturales, el grupo tiol de la cisteína, el grupo amino de la lisina, el grupo carboxilo del aspartato o el glutamato, el grupo guanidinio de la arginina, el grupo fenólico de la tirosina o el grupo hidroxilo de la serina. Los aminoácidos no naturales pueden proporcionar un amplio abanico de grupos reactivos, incluyendo un grupo azida, queto-carbonilo, alquino, vinilo o haluro de arilo. El grupo amino y el grupo carboxilo de los extremos del polipéptido también pueden actuar como grupos reactivos para formar enlaces covalentes con un andamiaje molecular/núcleo molecular.

Los polipéptidos de la invención contienen por lo menos tres grupos reactivos. Dichos polipéptidos también pueden contener cuatro o más grupos reactivos. A más grupos reactivos utilizados, más bucles pueden formarse en el andamiaje molecular.

55 En una realización preferente, se generan polipéptidos con tres grupos reactivos. La reacción de dichos polipéptidos con un andamiaje molecular/núcleo molecular con una simetría rotacional triple genera un único producto isomérico. La generación de un único producto isomérico resulta favorable por varios motivos. Los ácidos nucleicos de las bibliotecas de compuestos codifican únicamente las secuencias primarias del polipéptido pero no el estado isomérico de las moléculas que se forman con la reacción del polipéptido con el núcleo molecular. En el caso de sólo pueda

formarse un producto isomérico, la asignación del ácido nucleico al producto isomérico está claramente definida. En el caso de que se formen múltiples productos isoméricos, el ácido nucleico no puede proporcionar información sobre la naturaleza del producto isomérico que ha sido aislado en un procedimiento de cribado o selección. La formación de un único producto isomérico también resulta ventajosa en el caso de que se sintetice un elemento específico de una biblioteca de la invención. En este caso, la reacción química del polipéptido con el andamiaje molecular rinde un único producto isomérico y no una mezcla de isómeros.

En otra realización de la invención, se generan polipéptidos con cuatro grupos reactivos. La reacción de dichos polipéptidos con un andamiaje molecular/núcleo molecular con simetría tetrahédrica genera dos productos isoméricos. Aunque los dos productos isoméricos diferentes están codificados por un único ácido nucleico, puede determinarse la naturaleza isomérica del isómero aislado mediante la síntesis química de ambos isómeros, separando los dos isómeros y sometiendo a ensayo ambos isómeros para la unión a un ligando diana.

En una realización de la invención, por lo menos uno de los grupos reactivos de los polipéptidos es ortogonal respecto a los grupos reactivos restantes. La utilización de grupos reactivos ortogonales permite dirigir dichos grupos reactivos ortogonales a sitios específicos del núcleo molecular. Las estrategias de unión que implican grupos reactivos ortogonales pueden utilizarse para limitar el número de productos isoméricos formados. En otras palabras, mediante la selección de grupos reactivos diferenciados o diferentes para uno o más de los por lo menos tres enlaces respecto de los seleccionados para el resto de los por lo menos tres enlaces, puede conseguirse útilmente un orden particular de enlace o dirección de grupos reactivos específicos del polipéptido a posiciones específicas en el andamiaje molecular.

En otra realización, los grupos reactivos del polipéptido de la invención se hacen reaccionar con conectores moleculares, en donde dichos conectores son capaces de reaccionar con un andamiaje molecular de manera que el conector se encontrará en posición intermedia entre el andamiaje molecular y el polipéptido en el estado unido final.

En algunas realizaciones, los aminoácidos de los elementos de las bibliotecas o juegos de polipéptidos pueden sustituirse por cualquier aminoácido natural o no natural. Se excluyen de estos aminoácidos intercambiables los que incluyen grupos funcionales para el entrecruzamiento de los polipéptidos con un núcleo molecular, de manera que son intercambiables únicamente las secuencias de bucle. Las secuencias de polipéptido intercambiables presentan secuencias aleatorias, secuencias constantes o secuencias con aminoácidos aleatorios y constantes. Los aminoácidos con grupos reactivos se localizan en posiciones definidas dentro del polipéptido, ya que la posición de estos aminoácidos determina el tamaño del bucle.

En una realización, un polipéptido con tres grupos reactivos presenta la secuencia $(X)_l Y(X)_m Y(X)_n Y(X)_o$, en donde Y representa un aminoácido con un grupo reactivo, X representa un aminoácido aleatorio, m y n son números entre 3 y 6 que definen la longitud de los segmentos de polipéptido intermedios, que puede ser igual o diferente, e l y o son números entre 0 y 20 que definen la longitud de los segmentos polipeptídicos flanqueantes.

Pueden utilizarse alternativas a las conjugaciones mediadas por tiol para unir el andamiaje molecular al péptido mediante interacciones covalentes. Alternativamente, dichas técnicas pueden utilizarse para la modificación o unión de fracciones adicionales (tales como moléculas pequeñas de interés que son diferentes del andamiaje molecular) al polipéptido después de ser seleccionadas o aisladas según la presente invención - en la presente realización, claramente el enlace no necesita ser covalente y puede comprender el enlace no covalente. Estos métodos pueden utilizarse en lugar de (o en combinación de) los métodos mediados por tiol mediante la producción de fagos que expresan proteínas y péptidos portadores de aminoácidos no naturales con los grupos reactivos químicos necesarios, en combinación con moléculas pequeñas que portan el grupo reactivo complementario, o mediante la incorporación de los aminoácidos no naturales en un polipéptido sintetizado química o recombinantemente en el caso de que la molécula se construya después de la etapa de selección/aislamiento. Puede encontrarse más información en el documento nº WO2009098450 o en Heinis et al., Nat. Chem. Biol. 2009, 5(7), 502-7.

(iv) Combinación de bucles para formar moléculas multiespecíficas

Los bucles de ligandos peptídicos, o repertorios de ligandos peptídicos, se combinan ventajosamente mediante secuenciación y síntesis *de novo* de un polipéptido que incorpora los bucles combinados. Alternativamente, pueden sintetizarse ácidos nucleicos codificantes de tales polipéptidos.

En el caso de que deban combinarse repertorios, en particular repertorios de bucles individuales, los ácidos nucleicos codificantes de los repertorios ventajosamente se digieren y religan, formando un nuevo repertorio que presenta combinaciones de bucles diferentes de las de los repertorios constituyentes. Entre los vectores fagos pueden incluirse policonectores y otros sitios para enzimas de restricción que pueden proporcionar puntos únicos para el corte y religación de los vectores, creando los ligandos peptídicos multiespecíficos deseados. Los métodos para manipular bibliotecas fágicas son bien conocidos con respecto a anticuerpos y también pueden aplicarse al presente caso.

(v) Unión de grupos efectores y grupos funcionales

Los grupos efectores y/o funcionales pueden unirse, por ejemplo, a los extremos N- o C-terminales del polipéptido, o al andamiaje molecular.

Entre los grupos efectores apropiados se incluyen anticuerpos y partes o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, un grupo efector puede incluir una región constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), un dominio de cadena pesada CH1 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH3 de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos, además de uno o más dominios de región constante. Un grupo efector puede comprender además una región bisagra de un anticuerpo (tal como una región normalmente presente entre los dominios CH1 y CH2 de una molécula de IgG).

En una realización preferente adicional de este aspecto de la invención, un grupo efector según la presente invención es una región Fc de una molécula de IgG. Ventajosamente, un ligando peptídico-grupo efector según la presente invención comprende o consiste en una fusión de ligando peptídico-Fc que presenta una semivida $t_{1/2}$ de un día o más, de dos días o más, de 3 días o más, de 4 días o más, de 5 días o más, de 6 días o más o de 7 días o más. Lo más ventajosamente, el ligando peptídico según la presente invención comprende o consiste en una fusión de ligando peptídico-Fc que presenta una semivida $t_{1/2}$ de un día o más.

Entre los grupos funcionales se incluyen, en general, grupos de unión, fármacos, grupos reactivos para la unión de otras entidades, grupos funcionales que ayudan a la incorporación de los péptidos macrocíclicos en las células, y similares.

La capacidad de los péptidos de penetrar en las células permite que los péptidos contra dianas intracelulares resulten eficaces. Entre las dianas a las que pueden acceder los péptidos con la capacidad de penetrar en las células se incluyen factores de transcripción, moléculas de señalización intracelular, tales como tirosina quinasas y moléculas que participan en la ruta apoptótica. Entre los grupos funcionales que permiten la penetración en las células se incluyen péptidos o grupos químicos que han sido añadidos al péptido o al andamiaje molecular. Péptidos tales como los derivados de VP22, VIH-Tat, una proteína Homeobox de *Drosophila* (Antennapedia), p.ej., tal como se describe en Chen and Harrison, Biochemical Society Transactions (2007) volumen 35, parte 4, p821 "Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets" y "Intracellular delivery of large molecules and small peptides by cell penetrating peptides", de Gupta et al., en: Advanced Drug Discovery Reviews (2004), volumen 57, 9637. Entre los ejemplos de péptidos cortos que se ha demostrado que resultan eficientes en la traslocación a través de membranas plasmáticas se incluyen el péptido pentratina de 16 aminoácidos de la proteína Antennapedia de *Drosophila* (Derossi et al. (1994), J. Biol. Chem., volumen 269, p10444, "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes"), el 'péptido anfipático modelo' de 18 aminoácidos (Oehlke et al. (1998) Biochim Biophys Acts, volumen 1414, p127, "Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically") y las regiones ricas en arginina de la proteína TAT del VIH. Entre los nuevos enfoques no peptídicos se incluyen la utilización de miméticos de molécula pequeña o SMOC que pueden enlazarse fácilmente a biomoléculas (Okuyama et al. (2007) Nature Methods, volumen 4, p153, 'Small-molecule mimics of an α -helix for efficient transport of proteins into cells'. Otras estrategias químicas para añadir grupos guanidinio a las moléculas también potencian la penetración celular (Elson-Scwab et al. (2007) J. Biol. Chem., volumen 282, p13585, "Guanidinylated Neomycin Delivers Large Bioactive Cargo into cells through a heparin Sulphate Dependent Pathway"). Pueden añadirse moléculas de peso molecular reducido, tales como esteroides, al andamiaje molecular para potenciar la incorporación en las células.

Una clase de grupos funcionales que puede unirse a los ligandos peptídicos incluye anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, tales como Fab, Fv o fragmentos de un solo dominio. En particular, pueden utilizarse anticuerpos que se unen a proteínas capaces de incrementar la semivida del ligando péptido in vivo.

También pueden incorporarse péptidos RGD, los cuales se unen a las integrinas que se encuentran presentes sobre muchas células.

En una realización, un ligando péptido-grupo efector según la invención presenta una semivida $t_{1/2}$ seleccionada del grupo que consiste en: 12 horas o más, 24 horas o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 7 días o más, 8 días o más, 9 días o más, 10 días o más, 11 días o más, 12 días o más, 13 días o más, 14 días o más, 15 días o más o 20 días o más. Ventajosamente, un ligando péptido-grupo efector o composición según la invención presentará una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización adicional, presentará una semivida $t_{1/2}$ de un día o más. En una realización todavía adicional, se encontrará en el intervalo de 12 a 26 horas.

Entre los grupos funcionales se incluyen fármacos, tales como agentes citotóxicos para la terapia del cáncer. Entre ellos se incluyen agentes alquilantes, tales como cisplatino y carboplatino, así como oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida; antimetabolitos, incluyendo los análogos de purina azatioprina y mercaptopurina, o análogos de pirimidina; alcaloides vegetales y terpenoides, incluyendo alcaloides vinca, tales como vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; podofilotoxina y sus derivados etopósido y tenipósido; taxanos, incluyendo paclitaxel, originalmente conocido como Taxol; inhibidores de topoisomerasa, incluyendo camptotecinas: irinotecán y topotecán, e inhibidores de tipo II, incluyendo amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, y tenipósido. Los agentes adicionales pueden incluir antibióticos antitumorales que incluyen el inmunosupresor dactinomicina (que se utiliza en los trasplantes renales), doxorubicina, epirubicina, bleomicina y otros.

Entre los grupos efectores posibles se incluyen además enzimas, por ejemplo, tales como carboxipeptidasa G2 para la utilización en la terapia de enzima/profármaco, en que el ligando péptido sustituye anticuerpos en ADEPT.

(vi) Modificación de péptido

Para desarrollar los péptidos bicíclicos (biciclos; péptidos conjugados con andamiajes moleculares) en una molécula de tipo fármaco adecuada, sea para la inyección, inhalación, administración nasal, ocular, oral o tópica, deben considerarse varias propiedades. Necesitan diseñarse al menos lo siguiente en un biciclo cabeza de serie dado:

- 5
 - estabilidad frente a proteasas, se refiere a la estabilidad del biciclo frente a proteasas plasmáticas, proteasas epiteliales («ancladas a membrana»), proteasas gástricas e intestinales, proteasas de superficie pulmonar, proteasas intracelulares y similares. Debe mantenerse la estabilidad frente a proteasas en diferentes especies, de manera que pueda desarrollarse un candidato a biciclo cabeza de serie en modelos animales, así como administrarse con fiabilidad en el ser humano.
- 10
 - Sustitución de residuos sensibles a la oxidación, tales como el triptófano y la metionina, por análogos resistentes a la oxidación con el fin de mejorar el perfil de estabilidad farmacéutica de la molécula.
 - Perfil de solubilidad deseado, que es una función de la proporción de residuos cargados e hidrofílicos frente a hidrofóbicos, la cual resulta importante con fines de formulación y absorción.
- 15
 - Equilibrio correcto de residuos cargados frente a hidrofóbicos, ya que los residuos hidrofóbicos influyen sobre el grado de unión a proteínas plasmáticas y, de esta manera, la concentración de la fracción disponible libre en el plasma, mientras que los residuos cargados (en particular las argininas) pueden influir sobre la interacción del péptido con las membranas fosfolipídicas sobre las superficies celulares. Las dos en combinación pueden influir sobre la semivida, el volumen de distribución y la exposición del fármaco péptido, y pueden adaptarse de acuerdo con el criterio de evaluación clínico. Además, la combinación correcta y número de residuos cargados frente a hidrofóbicos puede reducir la irritación en el sitio de inyección (en donde el fármaco péptido se administra por vía subcutánea).
- 20
 - Una semivida adaptada, dependiendo de la indicación clínica y el régimen de tratamiento. Podría ser prudente desarrollar una molécula no modificada para la exposición breve en un contexto de gestión de la enfermedad aguda, o desarrollar un péptido bicíclico con modificaciones químicas que potencien la semivida en plasma y por tanto resultar óptimas para la gestión de estados de enfermedad más crónicos.
- 25

Los enfoques para estabilizar los candidatos a péptido terapéutico frente a la degradación proteolítica son numerosos y se solapan con el campo de los peptidomiméticos (para una revisión véase Gentilucci et al., *Curr. Pharmaceutical Design*, (2010), 16, 3185-203, y Nestor et al, *Curr. Medicinal Chem* (2009), 16, 4399-418).

Entre ellos se incluyen:

- 30
 - la ciclización del péptido;
 - la adición de caperuza N-terminal y C-terminal, habitualmente la acetilación N-terminal y la amidación C-terminal;
 - los escaneos de alaninas, para revelar y potencialmente eliminar el sitio o sitios de ataque proteolítico;
- 35
 - la sustitución de D-aminoácidos, para sondear los requisitos estéricos de la cadena lateral de aminoácidos, para incrementar la estabilidad proteolítica mediante impedimento estérico y por una propensión de los D-aminoácidos a estabilizar las conformaciones de giro β (Tugyi et al. (2005), *PNAS* 102(2), 413-418);
 - la sustitución por N-metil/N-alkil aminoácido para proporcionar protección proteolítica mediante la modificación directa del enlace amida escindible (Fiacco et al., *Chembiochem*. (2008), 9(14), 2200-3). La N-metilación también presenta un fuerte efecto sobre los ángulos de torsión del enlace peptídico y se cree que ayuda en la penetración celular y disponibilidad oral (Biron et al. (2008), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 2595 - 99);
- 40
 - Incorporación de aminoácidos no naturales, es decir, mediante la utilización
 - de cadenas laterales isostéricas/isoelectrónicas que no resultan reconocidas por proteasas, pero que no presentan ningún efecto sobre la potencia de la diana;
 - cadenas laterales de aminoácidos restringidas, de manera que la hidrólisis proteolítica del enlace peptídico próximo no se encuentra conformacional y estéricamente impedida. En particular, estas se refieren a análogos de prolina, cadenas laterales voluminosas, derivados disustituidos con Ca (en los que el derivado más simple es Aib, $H_2N-C(CH_3)_2-COOH$), y cicloaminoácidos, siendo un derivado simple el ácido aminociclopropilcarboxílico).
- 45
- 50
 - Sustitutos de enlace peptídico, y entre los ejemplos se incluyen:

- N-alquilación (véase anteriormente, es decir, CO-NR);
- enlaces peptídicos reducidos (CH₂-NH-);
- peptoides (N-alquil aminoácidos, NR-CH₂-CO);
- tioamidas (CS-NH);
- 5 ○ azapéptidos (CO-NH-NR);
- trans-alqueno (RHC=C-);
- retroinverso (NH-CO);
- sustitutos de urea (NH-CO-NHR);
- Modulación de la longitud del esqueleto peptídico,
- 10 ○ es decir, β^{2/3}- aminoácidos (NH-CR-CH₂-CO, NH-CH₂-CHR-CO);
- sustituciones en el carbono alfa en los aminoácidos, que restringe la conformación del esqueleto, siendo el derivado más simple el ácido aminoisobutírico (Aib).

Debe indicarse explícitamente que algunas de estas modificaciones también pueden servir para mejorar deliberadamente la potencia del péptido contra la diana o, por ejemplo, para identificar potentes sustitutos para los aminoácidos sensibles a la oxidación (Trp y Met).

15 aminoácidos sensibles a la oxidación (Trp y Met).

(B) Repertorios, juegos y grupos de ligandos polipeptídicos.

(i) Construcción de bibliotecas

Pueden construirse bibliotecas destinadas a la selección utilizando técnicas conocidas, por ejemplo tal como se indica en el documento n° WO2004/077062, o sistemas biológicos, incluyendo los sistemas de vector fago tal como se indica en la presente memoria. Se conocen de la técnica otros sistemas de vector, y entre ellos se incluyen otros fagos (por ejemplo, el fago lambda), vectores de expresión de plásmido bacteriano, vectores de expresión a base de células eucarióticas, incluyendo vectores de levadura y similares. Por ejemplo, véase el documento n° WO2009098450 o Heinis et al., Nat. Chem. Biol. 2009, 5(7), 502-7.

Los sistemas no biológicos, tales como los indicados en el documento n° WO2004/077062, se basan en enfoques convencionales de cribado químico. Son simples pero no poseen la potencia de los sistemas biológicos, ya que resulta imposible, o al menos impracticablemente complejo, cribar bibliotecas grandes de ligandos péptidos. Sin embargo, resultan útiles en el caso de que, por ejemplo, sólo se requiera el cribado de un número reducido de ligandos péptidos. El cribado mediante tales ensayos individuales, sin embargo, puede resultar laborioso y el número de moléculas únicas que puede someterse a ensayo para la unión a una diana específica generalmente no excede de 10⁶ entidades químicas.

En contraste, el cribado biológico o los métodos de selección generalmente permiten el muestreo de un número mucho mayor de diferentes moléculas. De esta manera, pueden utilizarse métodos biológicos en aplicación de la invención. En procedimientos biológicos, las moléculas se someten a ensayo en un único reactor y las que presentan propiedades favorables (es decir, ligantes) se separan físicamente de las moléculas inactivas. Se dispone de estrategias de selección que permiten generar y someter a ensayo simultáneamente más de 10¹³ compuestos individuales. Son ejemplos de potentes técnicas de selección por afinidad, la presentación en fagos, la expresión ribosómica, la expresión de ARNm, la expresión en levaduras, la expresión bacteriana o los métodos de aptámeros de ARN/ADN. Estos métodos biológicos de selección in vitro tienen en común que los repertorios de ligandos están codificados por ADN o ARN. Permiten la propagación e identificación de ligandos seleccionados mediante secuenciación. La tecnología de presentación en fagos se ha utilizado, por ejemplo, para el aislamiento de anticuerpos con afinidades de unión muy elevadas para virtualmente cualquier diana.

Al utilizar un sistema biológico, una vez se ha seleccionado un sistema de vector y se ha clonado una o más secuencias de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos de interés en el vector de la biblioteca, puede generarse diversidad en las moléculas clonadas llevando a cabo mutagénesis antes de la expresión; alternativamente, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse antes de la mutagénesis y llevarse a cabo rondas adicionales de selección.

La mutagénesis de secuencias de ácido nucleico codificantes de polipéptidos estructuralmente optimizados se lleva a cabo mediante métodos moleculares estándares. Resulta de particular uso la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Mullis y Faloona (1987), Methods Enzymol. 155: 335). La PCR, que utiliza múltiples ciclos de replicación del ADN catalizados por una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN para amplificar la secuencia diana de

interés, es bien conocida en la técnica. La construcción de diversas bibliotecas de anticuerpos se ha comentado en Winter et al. (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55, y referencias citadas en la misma.

5 Alternativamente, dadas las cortas longitudes de cadena de los polipéptidos según la invención, las variantes se sintetizan preferiblemente *de novo* y se insertan en vectores de expresión adecuados. La síntesis de péptidos puede llevarse a cabo mediante técnicas estándares conocidas en la técnica, tal como se ha descrito anteriormente. Los sintetizadores automáticos de péptidos se encuentran ampliamente disponibles, tales como ABI 433 de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

(ii) Diversidad codificada genéticamente

10 Los polipéptidos de interés están codificados genéticamente. Ello ofrece la ventaja de una diversidad incrementada junto con una fácil manipulación. Un ejemplo de una biblioteca de polipéptidos genéticamente codificados es una biblioteca de expresión de ARNm. Otro ejemplo es una biblioteca de paquete de expresión genética replicable (rgdp, por sus siglas en inglés), tal como una biblioteca de presentación en fagos. En la presente invención, los polipéptidos de interés están codificados genéticamente como biblioteca de presentación en fagos. De esta manera, el complejo de la invención comprende una partícula fágica. El ácido nucleico puede estar comprendido en el genoma fágico. En estas realizaciones, el polipéptido puede estar comprendido en la cubierta fágica.

15 En algunas realizaciones, la invención puede utilizarse para producir una biblioteca combinatorial codificada genéticamente de polipéptidos que se generan mediante la traducción de varios ácidos nucleicos en polipéptidos correspondientes y moléculas de unión de dicho andamiaje molecular a dichos polipéptidos.

20 La biblioteca combinatorial de polipéptidos codificada genéticamente se genera mediante presentación en fagos. En ejemplos de la exposición, los polipéptidos pueden generarse mediante expresión en levaduras, expresión ribosómica, expresión bacteriana o expresión de ARNm.

Las técnicas y metodología para llevar a cabo la presentación en fagos pueden encontrarse en el documento nº WO2009098450.

25 En una realización, el cribado puede llevarse a cabo mediante la puesta en contacto de una biblioteca, juego o grupo de ligandos polipéptidos con una diana y el aislamiento de uno o más elementos que se unen a dicha diana.

En otra realización, los elementos individuales de dicha biblioteca, juego o grupo se ponen en contacto con una diana en un cribado y se identifican los elementos de dicha biblioteca que se unen a dicha diana.

En otra realización, los elementos de dicha biblioteca, juego o grupo se ponen en contacto simultáneamente con una diana y se seleccionan los elementos que se unen a dicha diana.

30 La diana o dianas pueden ser un péptido, una proteína, un polisacárido, un lípido, un ADN o un ARN.

La diana puede ser un receptor, un ligando de receptor, un enzima, una hormona o una citoquina.

La diana puede ser una proteína procariótica, una proteína eucariótica o una proteína arqueobacteriana. Más específicamente, el ligando diana puede ser una proteína de mamífero o una proteína de insecto o una proteína bacteriana o una proteína fúngica o una proteína vírica.

35 El ligando diana puede ser un enzima, tal como una proteasa.

Debe indicarse que la invención comprende además ligandos polipéptidos aislados a partir de un cribado según la invención. En una realización, el método o métodos de cribado de la invención comprenden además la etapa de: fabricar una cantidad del polipéptido aislado como capaz de unirse a dichas dianas.

40 La invención se refiere además a ligandos péptidos que presentan más de dos bucles. Por ejemplo, los polipéptidos tricíclicos unidos a un andamiaje molecular pueden crearse uniendo los extremos N-terminales y C-terminales de un polipéptido bicíclico unido a un andamiaje molecular según la presente invención. De esta manera, los extremos N- y C-terminales unidos crean un tercer bucle, produciendo un polipéptido tricíclico. Esta realización no necesita llevarse a cabo sobre un fago sino que puede llevarse a cabo sobre un conjugado de polipéptido-andamiaje molecular tal como se describe en la presente memoria. La unión de los extremos N- y C-terminales es una cuestión de química rutinaria de péptidos. En caso de que se requiera cualquier guía, el extremo C-terminal puede activarse y/o los extremos N- y C-terminales pueden extenderse, por ejemplo para añadir una cisteína en cada extremo, y después unirlos mediante enlace disulfuro. Alternativamente, la unión puede llevarse a cabo utilizando una región conectora incorporada en los extremos N/C. Alternativamente, los extremos N- y C-terminales pueden unirse mediante un enlace peptídico convencional. Alternativamente, puede utilizarse cualquier otro medio adecuado para unir los extremos N- y C-terminales, por ejemplo la ciclización N-C puede llevarse a cabo mediante técnicas estándares, por ejemplo tal como se da a conocer en Linde et al., Peptide Science 90, 671-682 (2008), "Structure-activity relationship and metabolic stability studies of backbone cyclization and N-methylation of melanocortin peptides", o tal como en Hess et al. J. Med. Chem. 51, 1026-1034 (2008) "backbone cyclic peptidomimetic melanocortin-4 receptor agonist as a novel orally administered drug lead for treating obesity". Otra ventaja de tales moléculas tricíclicas es la evitación de la degradación

proteolítico de los extremos libres, en particular por la acción de exoproteasas. Otra ventaja de un polipéptido tricíclico de esta naturaleza es que el tercer bucle puede utilizarse para funciones generalmente aplicables, tales como la unión de BSA, la entrada en la célula o efectos de transporte, etiquetado o cualquier otro de tales usos. Se observará que este tercer bucle típicamente no se encontrará disponible para la selección (debido a que no se produce sobre el fago sino sólo sobre el conjugado de polipéptido-andamiaje molecular) y por tanto su utilización para otra de tales funciones biológicas todavía deja ventajosamente ambos bucles 1 y 2 para la selección/creación de especificidad.

(iii) Purificación de fagos

Según la presente invención, la purificación de fagos antes de la reacción con el andamiaje molecular es opcional. En el caso de que se desee la purificación, puede utilizarse cualquier medio para la purificación del fago. Pueden aplicarse técnicas estándares en la presente invención. Por ejemplo, el fago puede purificarse mediante filtración o mediante precipitación, tal como la precipitación con PEG; las partículas de fago pueden producirse y purificarse mediante precipitación con polietilenglicol (PEG), tal como se ha descrito anteriormente. Puede encontrarse más información en el documento nº WO2009098450.

En el caso de que se requieran guías adicionales, se hace referencia a Jespers et al. (Protein Engineering Design and Selection 2004, 17(10):709-713, Selection of optical biosensors from chemisynthetic antibody libraries). En una realización, el fago puede purificarse tal como se enseña en esta referencia. El texto de esta publicación se incorpora específicamente en la presente memoria como referencia para el método de purificación de fagos, en particular se hace referencia a la sección de materiales y métodos que se inicia en la columna derecha de la página 709 de Jespers et al.

Además, el fago puede purificarse tal como se publica en Marks et al., J. Mol. Biol. Vol. 222, pp581-597, al que se hace referencia específica para la descripción particular de cómo se lleva a cabo la producción/purificación del fago.

En el caso de que no se desee la purificación del fago, el medio de cultivo que incluye el fago puede mezclarse directamente con una resina de purificación y un agente reductor (tal como TCEP), tal como se indica en los ejemplos en la presente memoria.

(iv) Química de la reacción

En comparación con las condiciones que se indicaron en el documento nº WO2009098450, de Heinis et al., la química de reacción utilizada en la presente invención proporciona una generación rápida y eficiente de ligandos polipéptidos presentados sobre fagos. Las condiciones de reacción utilizadas en la presente invención preferiblemente comprenden las etapas siguientes, todas llevadas a cabo preferiblemente a temperatura ambiente.

1. El medio de cultivo del que se han eliminado las células bacterianas, que contiene el fago que expresa el polipéptido o polipéptidos deseados, se mezcla con tampón, agente reductor y resina equilibrada en el tampón.
2. Se aísla la resina y se resuspende en tampón y agente reductor diluido.
3. Los polipéptidos se exponen al andamiaje molecular y se hacen reaccionar con el mismo de manera que el andamiaje molecular forma enlaces covalentes con el polipéptido.
4. Las muestras se lavan para eliminar el exceso de andamiaje no reaccionado.
5. Se eluye el fago de la resina.

El tampón preferiblemente presenta un pH de 8,0; no resulta necesario ajustar el pH en la solución final. Entre los tampones adecuados se incluye NaHCO_3 , inicialmente a pH 8,0. Pueden utilizarse tampones alternativos, incluyendo tampones con un pH en el intervalo fisiológico, incluyendo NH_4CO_3 , HEPES y tris-hidroximetil aminoetano, Tris, Tris-acetato o MOPS. El tampón NaHCO_3 preferiblemente se utiliza a una concentración de 1 M, añadiendo 1 ml a una suspensión de resina para equilibrar la resina. La resina preferiblemente es una resina de intercambio iónico. Las resinas de intercambio iónico son conocidas en la técnica y entre ellas se incluye cualquier material adecuado para la cromatografía de intercambio aniónico conocida en la técnica, tal como un material de cromatografía basado en agarosa, p.ej. sefarosas como Fast Flow o Capto, material sintético polimérico, p.ej., un polimetacrilato, tal como Toyopearl, poliestireno/divinilbenceno, tal como Poros, Source o celulosa, p.ej. Cellufine. En una realización preferente, el material de resina de intercambio aniónico incluye, aunque sin limitarse a ellos, una resina que porta una amina primaria como ligando, p.ej., aminohexil-sefarosa, benzamidín-sefarosa, lisina-sefarosa o arginina-sefarosa. En otra realización preferente, el material de resina de intercambio aniónico incluye, aunque sin limitación, una resina que presenta un resto cargado positivamente a pH neutro, tal como alquilaminoetano, como dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE) o trimetilaminoetil (TMAE), polietiliminina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE), amonio cuaternario (Q) y similares.

En la etapa (1), se añade agente reductor a una concentración de 1 mM. El agente reductor diluido utilizado en la etapa (2) preferentemente se encuentra a una concentración de 1 μM . Ambas concentraciones son para TCEP y pueden aplicarse otros valores a otros agentes reductores. El agente reductor diluido se utiliza para mantener el

polipéptido en un estado reducido antes de la reacción con el andamiaje molecular. Preferiblemente, se incluye un agente quelante en la etapa de lavado. por ejemplo, puede incluirse EDTA.

5 Agentes reductores alternativos pueden seleccionarse de ditiotreitól, ácido tioglicólico, ácido tioláctico, ácido 3-mercaptopropiónico, ácido tiomálico, ácido 2,3-dimercaptosuccínico, cisteína, N-glicil-L-cisteína, L-cisteinilglicina y también ésteres y sales de los mismos, tioglicerol, cisteamina y derivados acio C1-C4 de los mismos, N-mesilcisteamina, N-acetilcisteína, N-mercaptoalquilamidas de azúcares, tales como N-(mercapto-2-etil)gluconamida, panteteína, N-(mercaptoalquil)-co-hidroxiálquilamidas, por ejemplo las descritas en la solicitud de patente nº EP-A-354 835, N-mono- o N,N-dialquilmercapto-4-butiramidas, por ejemplo las descritas en la solicitud de patente nº EP-A-368 763, aminomeraptoalquil amidas, por ejemplo las descritas en la solicitud de patente nº EP-A-432 000, ácidos N-
10 (mercaptoalquil)succinámico y N-(mercaptoalquil)succinimidas, por ejemplo los descritos en la solicitud de patente nº EP-A-465 342, mercaptoalquil amidas de alquilamina, por ejemplo las descritas en la solicitud de patente nº EP-A-514 282, la mezcla azeotrópica de tioglicolato de 2-hidroxiopropilo y de tioglicolato de (2-hidroxi-1-metil)etilo tal como se describe en la solicitud de patente nº FR-A-2 679 448, amidas de mercaptoalquilamino, por ejemplo las descritas en la solicitud de patente nº FR-A-2 692 481 y N-mercaptoalquilalcanodiamidas, por ejemplo las descritas en la solicitud
15 de patente nº EP-A-653 202.

La conjugación del andamiaje molecular, en el caso de TBMB y otros andamiajes cuyos grupos reactivos son reactivos con tiol, preferiblemente se lleva a cabo en presencia de acetonitrilo. El acetonitrilo preferentemente se encuentra a una concentración final de aproximadamente 20%.

En la presente memoria se comentan andamiajes alternativos a TBMB.

20 Se elimina el andamiaje molecular no reaccionado del fago mediante lavado. A continuación, el fago puede eluirse de la resina y seleccionarse tal como se ha indicado anteriormente.

También pueden incluirse en el procedimiento etapas adicionales. Tales etapas no son obligatorias y no incrementan significativamente el rendimiento o la eficiencia del procedimiento.

25 Por ejemplo, el medio de cultivo que contiene fagos, en combinación con la resina, puede lavarse antes de la reducción con el agente reductor. El agente reductor mismo puede añadirse en dos etapas: en una forma concentrada, para llevar a cabo la reducción, y en forma diluida (etapa 2, anteriormente), para mantener el polipéptido presentado en un estado reducido.

30 La temporización de las etapas también puede modificarse, sin alterar significativamente la eficiencia del procedimiento. Por ejemplo, los presentes inventores han encontrado que la reducción en TCEP durante 20 minutos resulta tan eficaz como la reducción durante 30 minutos. De manera similar, la reacción con TBMB durante 10 minutos no proporciona un nivel significativamente inferior de unión que la reducción durante 30 minutos.

(v) Separación magnética

35 En una realización ventajosa, la resina es magnética. Esto permite aislar el fago portador de polipéptido mediante separación magnética. Las perlas de resina magnética, tales como las perlas de sefarosa magnética, pueden obtenerse comercialmente de, por ejemplo, Bangs Laboratories, Invitrogen, Origene y GE Healthcare. Véase también las patentes nº US 2.642.514 y nº GB 1239978. La aplicación de un campo magnético permite aislar las perlas, dando como resultado la purificación de los polipéptidos unidos a las perlas respecto del medio en que se encuentran contenidas.

40 En una realización, las perlas magnéticas se separan del medio mediante inserción de una sonda magnética en el medio. Las perlas resultan retenidas sobre la sonda magnética y pueden transferirse a una estación de lavado o a un medio diferente. Alternativamente, las perlas pueden aislarse mediante la aplicación de un campo magnético al recipiente en el que se encuentran contenidas y eliminando el medio una vez se han inmovilizado las perlas.

La separación magnética proporciona un procesamiento más rápido y más eficiente de las resinas en el método de la invención.

45 (C) Utilización de ligandos polipéptidos según la invención

Los ligandos polipéptidos seleccionados según el método de la presente invención pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas in vivo, aplicaciones diagnósticas in vitro e in vivo, aplicaciones in vitro de ensayo y reactivo, y similares. Los ligandos con niveles seleccionados de especificidad resultan útiles en aplicaciones que implican el ensayo en animales no humanos, en los que resulta deseable la reactividad cruzada, o en aplicaciones diagnósticas,
50 en las que la reactividad cruzada con homólogos o parálogos necesita controlarse cuidadosamente. En algunas aplicaciones, tales como aplicaciones de vacuna, la capacidad de inducir una respuesta inmunológica a rangos predeterminados de antígenos puede explotarse para adaptar una vacuna a enfermedades y patógenos específicos.

Los ligandos péptidos sustancialmente puros con una homogeneidad de al menos 90% a 95% resultan preferentes para la administración en un mamífero, y una homogeneidad de 98% a 99% resulta la más preferente para el uso

farmacéutico, especialmente en el caso de que el mamífero sea un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad, según se desee, los polipéptidos seleccionados pueden utilizarse para el diagnóstico o la terapia (incluyendo extracorpóreamente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) *Immunological Methods*, volúmenes I y II, Academic Press, NY).

Los ligandos péptidos de la presente invención típicamente encuentran utilidad en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunológicos (que incluyen, aunque sin limitarse a ellos, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia grave).

10 En la presente solicitud, el término «prevención» implica la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. «Supresión» se refiere a la administración de la composición después de un suceso de inducción, aunque antes de la aparición clínica de la enfermedad. «Tratamiento» implica la administración de la composición protectora después de volverse manifiestos los síntomas de enfermedad.

15 Se encuentran disponibles sistemas de modelo animal que pueden utilizarse para el cribado para eficacia de los ligandos péptidos en la protección frente a la enfermedad o el tratamiento de la misma. La utilización de sistemas de modelo animal resulta facilitada por la presente invención, que permite el desarrollo de ligandos polipéptidos que pueden reaccionar cruzadamente con dianas humanas y animales, permitiendo la utilización de modelos animales.

20 Los métodos para el ensayo del lupus eritematoso sistémico (LES) en ratones susceptibles son conocidos en la técnica (Knight et al. (1978) *J. Exp. Med.* 147: 1653; Reinersten et al. (1978) *New Eng. J. Med.* 299: 515). Se sometió a ensayo la miastenia grave (MG) en ratones SJL/J hembra mediante inducción de la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom et al. (1988) *Adv. Inzn7unol.*, 42: 233). Se indujo artritis en una cepa susceptible de ratones mediante inyección de colágeno de tipo II (Stuart et al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Se ha descrito un modelo por el que se induce artritis adyuvante en ratas susceptibles mediante la inyección de proteína de choque térmico micobacteriana (Van Eden et al. (1988) *Nature*, 331: 171). Se indujo tiroiditis en ratones mediante la administración de tiroglobulina tal como se ha descrito (Maron et al. (1980) *J. Exp. Med.* 152: 1115). La diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) se produce naturalmente o puede inducirse en determinadas cepas de ratones, tales como las descritas por Kanasawa et al. (1984) *Diabetologia*, 27: 113. EAE en ratones y ratas sirve como modelo de EM en el ser humano. En este modelo, se induce la enfermedad desmielinizante mediante la administración de la proteína básica mielina (véase Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer et al., eds., Grune y Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al. (1973) *Science*, 179: 478; y Satoh et al. (1987) *J. Immunol.*, 138: 179).

30 Generalmente, los presentes ligandos péptidos se utilizan en forma purificada junto con portadores farmacológicamente apropiados. Típicamente, entre estos portadores se incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo cualquiera de ellas solución salina y/o medio tamponado. Entre los vehículos parenterales se incluye solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y solución lactato de Ringer. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, en caso necesario para mantener un complejo polipeptídico en suspensión, pueden seleccionarse de espesantes, tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

35 Entre los vehículos intravenosos se incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes y reabastecedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer. También pueden encontrarse presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16a edición).

40 Los ligandos péptidos de la presente invención pueden utilizarse como composiciones administradas separadamente o junto con otros agentes. Entre ellos pueden incluirse anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y diversos fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Entre las composiciones farmacéuticas pueden incluirse «cócteles» de diversos agentes citotóxicos o de otro tipo junto con los anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de unión de los mismos de la presente invención, o incluso combinaciones de polipéptidos seleccionados según la presente invención con diferentes especificidades, tales como polipéptidos seleccionados utilizando diferentes ligandos diana, se agrupan o no antes de la administración.

45 La vía de administración de las composiciones farmacéuticas según la invención puede ser cualquiera de las comúnmente conocidas por el experto ordinario en la materia. Para la terapia, incluyendo sin limitación la inmunoterapia, los anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de unión de los mismos de la invención pueden administrarse en cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándares. La administración puede ser por cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, por vía pulmonar, o también, apropiadamente, mediante infusión directa con un catéter. La dosis y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y condición del paciente, la administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que deben ser considerados por el clínico.

50 Los ligandos péptidos de la presente invención pueden liofilizarse para el almacenamiento y reconstituirse en un portador adecuado antes de la utilización. Se ha demostrado que esta técnica resulta eficaz y pueden utilizarse

técnicas conocidas de liofilización y reconstitución. El experto en la materia apreciará que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad y que los niveles de uso podrían tener que ajustarse al alza para compensar.

5 Las composiciones que contienen los presentes ligandos péptidos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En determinadas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para conseguir una inhibición, supresión, modulación, muerte o algún otro parámetro medible por lo menos parcial de una población de células seleccionadas se define como una «dosis terapéuticamente eficaz». Las cantidades necesarias para conseguir esta dosis dependerá de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunológico del paciente, aunque generalmente se encuentran comprendidas entre 0,005 y 5,0 mg de ligando péptido seleccionado por kilogramo de peso corporal, utilizándose más comúnmente dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes ligandos péptidos o cócteles de los mismos también pueden administrarse a dosis similares o ligeramente más bajas.

15 Una composición que contiene un ligando péptido según la presente invención puede utilizarse en contextos profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, muerte o eliminación de una población celular diana seleccionada en un mamífero. Además, los repertorios seleccionados de polipéptidos descritos en la presente memoria pueden utilizarse extracorpóreamente o selectivamente *in vitro* para matar, disminuir o de otro modo eliminar eficazmente una población celular diana de una colección heterogénea de células. La sangre de un mamífero puede combinarse extracorpóreamente con los ligandos péptidos seleccionados, de manera que se matan las células no deseadas o de otro modo se eliminan de la sangre para el retorno al mamífero de acuerdo con técnicas estándares.

20 (D) Mutación de polipéptidos

La diversidad deseada típicamente se genera modificando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones que deben modificarse se seleccionan de manera que se construyen bibliotecas para cada posición individual en las secuencias de bucle. En caso apropiado, pueden omitirse una o más posiciones del procedimiento de selección, por ejemplo en el caso de que resulte evidente que estas posiciones no se encuentran disponibles para la mutación sin pérdida de actividad.

La variación puede conseguirse entonces mediante aleatorización, durante la que el aminoácido residente es sustituido por cualquier aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, produciendo un número muy grande de variantes o mediante sustitución del aminoácido residente por uno o más de un subgrupo definido de aminoácidos, produciendo un número más limitado de variantes.

30 Se ha informado de diversos métodos para introducir tal diversidad. Los métodos para mutar posiciones seleccionadas también son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen oligonucleótidos incorrectamente apareados u oligonucleótidos degenerados, utilizando o no la PCR. Por ejemplo, se han creado varias bibliotecas de anticuerpos sintéticos mediante la localización de mutaciones en los bucles de unión de antígeno. Podrían utilizarse las mismas técnicas en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, la región H3 de un Fab de unión a toxoide tetánico humano se ha aleatorizado para crear un abanico de nuevas especificidades de unión (Barbas et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457). Se han unido regiones H3 y L3 aleatorias o semialeatorias a segmentos del gen V de la línea germinal para producir bibliotecas grandes con regiones marco mutadas (Hoogenboom y Winter (1992) R Mol. Biol., 227: 381; Barbas et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissim et al. (1994) EMBO J, 13: 692; Griffiths et al. (1994) EMBO J, 13: 3245; De Kruif et al. (1995) J. Mol. Biol., 248: 97). Tal diversificación se ha extendido para incluir algunos o todos los demás bucles de unión a antígeno (Cramer et al., (1996) Nature Med., 2: 100; Riechmann et al. (1995) Biotechnology, 13: 475; Morphosys, documento nº WO97/08320, supra).

Sin embargo, debido a que los polipéptidos utilizados en la presente invención son mucho más pequeños que los anticuerpos, el método preferente es sintetizar polipéptidos mutantes *de novo*. La mutagénesis de polipéptidos estructurados se ha descrito anteriormente, en relación a la construcción de una biblioteca.

45 La invención se describe adicionalmente a continuación haciendo referencia a los ejemplos siguientes:

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1:

El presente ejemplo se ha obtenido del documento nº WO2009/098450.

50 En el presente ejemplo los presentes inventores demuestran la unión de péptidos presentados en fagos a moléculas pequeñas. El polipéptido en el presente ejemplo es un péptido presentado en fagos. El ácido nucleico está comprendido en la partícula fágica. El andamiaje molecular en el presente ejemplo es una molécula pequeña (TBMB).

Típicamente se redujeron 10^{11} a 10^{12} u.t. de fago purificado con PEG en 20 ml de NH_4HCO_3 20 mM, pH 8 con TCEP 1 mM a 42°C durante 1 h. Se centrifugaron los fagos a 4.000 rpm en un filtro Vivaspin-20 (MWCO de 10.000) para reducir el volumen del tampón de reducción a 1 ml y se lavaron dos veces con 10 ml de tampón de reacción helado (55 NH_4HCO_3 20 mM, EDTA 5 mM, pH 8). Se ajustó el volumen de los fagos reducidos a 32 ml con tampón de reacción

y se añadieron 8 ml de TBMB 50 μ M en ACN para obtener una concentración de TBMB final de 10 μ M. La reacción se incubó a 30°C durante 1 h antes de eliminar el TBMB no reaccionado, mediante precipitación del fago con 1/5 volumen de PEG al 20%, NaCl 2,5 M sobre hielo y centrifugación a 4.000 rpm durante 30 minutos.

5 Los presentes inventores utilizaron el compuesto orgánico pequeño tris-(bromometil)benzeno (TBMB) como andamiaje para anclar los péptidos que contenían tres residuos de cisteína (Kemp, D. S. and McNamara, P. E., J. Org. Chem, 1985; figura 1B). Los alcanos de halógeno conjugados con un andamiaje aromático reaccionan específicamente con grupos tiol de cisteína en el solvente acuoso a temperatura ambiente (Stefanova, H. I., Biochemistry, 1993). Meloen y colaboradores habían utilizado anteriormente andamiajes sintéticos sustituidos con bromometilo para la inmovilización de péptidos con múltiples cisteínas (Timmerman, P. et al., ChemBioChem, 2005). Las condiciones suaves necesarias para la reacción de sustitución son convenientes para omitir la funcionalidad del fago (Olofsson, L., et al., J. of Molecular Recognition, 1998). Los presentes inventores seleccionaron las cisteínas como puntos de anclaje debido a que sus cadenas laterales presentan la reactividad más clara de entre los 20 aminoácidos naturales. Además, los residuos de cisteína son raros en las proteínas de la cubierta fágica (8 cisteínas en pIII, una cisteína en pVI, pVII y pIX; Petrenko, V. A. y Smith, G. P., Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery, 2005). La simetría rotacional triple de la molécula de TBMB garantiza la formación de un isómero estructural y espacial único con la reacción con tres cisteínas en un péptido.

A continuación, se prepararon las condiciones de reacción para la modificación de un péptido sobre el fago. Debido a que aparentemente resultaba difícil detectar el péptido modificado químicamente sobre el fago con las técnicas disponibles, los presentes inventores expresaron el péptido ^NGCGSGCGSGCG^C en forma de una fusión N-terminal con los dos dominios solubles D1 y D2 de la proteína menor de cubierta de fago pIII y analizaron el peso molecular de la proteína antes y después de la reacción con TBMB mediante espectrometría de masas. Los intentos para unir selectivamente las tres cisteínas en el péptido al andamiaje pero omitiendo los tres puentes disulfuro de los dominios D1 y D2 de pIII (C7-C36, C46-C53, C188-C201) fracasaron. Esto impulsó los presentes inventores a aprovechar una proteína del gen-3 libre de disulfuros desarrollada recientemente por Schmidt F. y colaboradores (Kather, I. et al., J. Mol. Biol., 2005). El péptido fusionado con el dominio N-terminal de la proteína pIII libre de cisteína se redujo con tris(carboxietil)fosfina (TCEP). Debido a que se observó que el agente reductor reaccionaba con los grupos bromometilo del andamiaje de TBMB, se eliminó antes de la adición de TBMB a la proteína. La reoxidación de los grupos tiol tras la eliminación de TCEP pudo evitarse mediante desgasificación del tampón de reacción y acomplejamiento de los iones metálicos con EDTA 5 mM. La reacción de los grupos tiol con TBMB a diversas concentraciones y el análisis espectrométrico de masas del producto revelaron que una concentración de 10 μ M de TBMB resultaba suficiente para la modificación cuantitativa del péptido a 30°C en una hora. Se formó predominantemente un producto con la masa molecular esperada (Δ masa esperada = 114 Da; figura 1A). Al incubar con TBMB el D1-D2 libre de disulfuros sin un péptido fusionado, no resultó modificada su masa, indicando que no se producen reacciones no específicas con otros aminoácidos. La adición de partículas fágicas a las reacciones (10¹⁰ u.t. por mililitro) reveló que la elevada densidad de proteínas de cubierta fágica en el recipiente no dificultaba la reacción del péptido con TBMB. Inesperadamente, los presentes inventores encontraron que la reacción de TBMB con los péptidos que contenían únicamente dos residuos de cisteína (^NAGSGCGSGCG^C-D1-D2) rendía un producto con una masa molecular que era consistente con la reacción del grupo bromometilo restante con la amina primaria del extremo N-terminal (figuras 2A y 2B). De manera similar, la reacción de TBMB con un péptido que presentaba una cisteína y una lisina (^NAGSGKSGSGCG^C-D1-D2) rindió una masa molecular esperada al reaccionar las aminas primarias de la lisina y el extremo N-terminal con los dos grupos bromometilo restantes (figuras 2C y 2D).

Ejemplo 2

Comparación de tet de tipo silvestre y fago de Schmid durante la modificación

45 Se estudió el efecto del procedimiento de modificación de TCEP y TBMB sobre la infectividad del fago utilizando FdTet de tipo silvestre (WT) en comparación con el fago de Schmid mutado, que se encuentra libre de disulfuro. Se cree que Schmid generalmente presenta un título más bajo, pero podría ser más resistente a la modificación química.

Se sometió a ensayo el fago siguiente:

- péptido PEP48 en FdTet WT, obtenido de S. Luzi (LMB, Cambridge)
- péptido PEP48 en fago de Schmid obtenido de S. Luzi
- 50 ◦ PK15 en FdTet WT de Edward Walker (Bicycle Therapeutics, Cambridge)

PEP48 y PK15 son dos péptidos diferentes que contienen tres residuos de cisteína cada uno. PK15 es específico para la calicreína; PEP48 es específico para mdm2. Ver la solicitud de patente europea nº EP2464727.

Se sembraron por estrías stocks de glicerol de estos fagos sobre placas con tetraciclina (constructos WT tetraciclina (tet)) o placas con cloranfenicol (clor) (constructo de Schmid).

55 Se recolectó una única colonia de cada constructo de las placas y se utilizó para inocular 1 ml de 2YT/tet o clor.

ES 2 700 999 T3

Se incubaron los cultivos a 37°C bajo agitación a 250 rpm durante ~3 h y después se enrasaron a 600 ml cada uno en matraces sin deflectores de 2 l.

Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C bajo agitación a 250 rpm.

A continuación, se procesaron los 3x cultivos de 600 ml del modo siguiente para purificar el fago:

- 5
 - se dividió cada cultivo de 600 ml en 2x botellas de centrifuga de 500 ml (6 botellas en total).
 - Las botellas se centrifugaron a 7.500 rpm en un rotor JA-10 (=~10.000 g) a 4°C durante 20 min;
 - se transfirió el sobrenadante a botellas nuevas de 500 ml y se reservaron las muestras para qPCR;
 - se añadieron 80 ml de PEG-NaCl frío a cada parte de ~300 ml;
 - se incubó el fago sobre hielo durante ~1 h
- 10
 - se centrifugaron los fagos a 7.500 rpm en un rotor JA-10 (=~10.000 g) a 4°C durante 30 min;
 - se eliminó el sobrenadante;
 - se resuspendieron los pellets de fagos en 5 ml (por cada constructo) de TE y se reservaron las muestras para qPCR.

El fago purificado se sometió a ensayo mediante qPCR para el título de partículas del modo siguiente:

- 15
 - se prepararon diluciones en serie del amplicón:
 - el amplicón se suministró a una concentración de 100 μM = 6×10^{13} moléculas por cada 1 μl
 - se prepararon diluciones en serie de 10 veces del amplicón en agua. Se generó un total de 6 diluciones, de 1 en 10^6 a 1 en 10^{11} . Se almacenaron a -20°C para el uso posterior.
- 20
 - El primer stock se preparó del modo siguiente: 20 μl de gen 7F2 + 20 μl de gen 7R2 + 60 μl de agua (:20 μM de cada cebador)
 - Se prepararon diluciones en serie de 10 veces de las muestras de fago, de 1 en 10^3 a 1 en 10^6 en agua
 - Se preparó la mezcla maestra de PCR:
 - 1 μl de solución de cebador
 - 1,75 μl de H₂O Sigma
 - 25 0,25 μl de fluoresceína 1 μM
 - 12 μl SYBRverde Jumpstart Taq Readymix (Sigma)
- Total de 15 μl por muestra se añadieron 15 μl de mezcla maestra a cada pocillo de la placa de PCR de 96 pocillos
- 30
 - Se añadieron a los pocillos 10 μl de dilución de amplicón o de dilución de fago; la placa se selló y se insertó en el aparato de PCR en tiempo real BioRad
 - se ejecutó el programa siguiente:
 - 95°C, 2,5 min
 - 95°C, 2,5 min
 - 95°C, 5 min
 - 95°C 10 s } x40
 - 60°C 30 s }
- 35
 - lectura de placa +

- curva de fusión
- mantenimiento a 10°C

- El programa se detuvo manualmente; al finalizar
- se extrajeron los datos del aparato de qPCR en Excel y se reorganizaron para formar columnas de amplicón vs valores de Ct
- se interpolaron los valores de Ct de las muestras a partir de la curva patrón.

El experimento anterior muestra que el tipo silvestre y el fago de Schmid presentan un potencial de crecimiento comparable al cultivarlo sin TBMB (ver la figura 8).

- 10 A continuación, los presentes inventores sometieron a ensayo la eficiencia comparativa de modificación de fago de tipo silvestre y de Schmid como resultado de la exposición a TBMB, de manera que TBMB se encontraba acomplejado con el polipéptido presentado.

- 15 Con el fin de equalizar las concentraciones de fago para la modificación, se diluyó una parte de cada fago purificado en tampón de NH₄CO₃/EDTA {NH₄CO₃ 20 mM; EDTA 5 mM; ~pH 8,3 (no ajustado); desgasificado}, de manera que la concentración final de fago era igual a la del sobrenadante de cultivo de PK15 (es decir, 3.4x10¹¹ por ml). Se requirieron 2,2 ml de solución diluida de fago.

- PK15 / FdTet WT: 17,6 µl de fago + 2.128 µl de tampón=2,2 ml de 3,4x10¹¹/ml
- PEP48 / FdTet WT: 179 µl de fago + 2.021 µl de tampón=2,2 ml de 3,4x10¹¹/ml
- PEP48/ Schmid: 649 µl de fago + 1.551 µl de tampón=2,2 ml de 3,4x10¹¹/ml

- 20 Se modificaron las condiciones de modificación con respecto a Heinis et al. La modificación del fago se llevó a cabo en 1 ml de tampón de NH₄CO₃/EDTA, incluyendo 10 µl de Tris 1 M, pH 8. Se expusieron los fagos a TCEP 1 mM durante 30 minutos en lugar de 1 hora, a temperatura ambiente y no a 42°C, seguido del aislamiento del fago y resuspensión en TCEP a 1 µM e inmediatamente se realsó. Finalmente, los fagos se suspendieron en 800 µl de tampón de NH₄CO₃/EDTA + 199 µl de acetonitrilo + TBMB 60 µM durante 30 minutos, antes del aislamiento y resuspensión en 50 µl de tampón citrato.

En cada estadio de aislamiento del fago, la recuperación de fago no era cuantitativa. Los fagos 'residuales', no retenidos en el procedimiento de aislamiento, se retuvieron para el análisis.

- 25 Se retuvieron los eluidos de fago (en tampón citrato). Para cada constructo, se modificó una muestra de fago con TCEP/TBMB o se procesó en ausencia de TCEP/TBMB.

Las soluciones de entrada residuales (antes del tratamiento) también se retuvieron.

- 30 Todas las muestras de fago, tanto del procedimiento de purificación como del procedimiento de modificación, se sometieron a ensayo mediante qPCR (tal como se ha descrito anteriormente) para determinar el número total de fagos presentes en cada etapa.

Las muestras de fagos del procedimiento de modificación (entradas, residuales, modificados y no modificados) se sometieron a ensayo para el título infectivo del modo siguiente:

Título infectivo:

- 35 • Una alícuota de la cepa HB2151 de E. coli se cultivó en 2YT hasta DO₆₀₀=~0,5 Esto representaba ~2,5x10⁸ células/ml
- las muestras de fagos se diluyeron 1 en 1.000 en 2YT
- se añadió 1 µl de muestra diluida a 1 ml de HB2151 (2,5X10⁸ células)
- las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C bajo agitación a 250 rpm
- se prepararon 7x diluciones en serie de 10 veces (puro→ 10⁻⁷) en 2YT
- 40 • se aplicó una mancha con 20 µl de cada uno sobre placas de agar con tetraciclina secas
- las placas se incubaron durante la noche a 37°C

Se analizaron los datos de títulos de partículas e infectivos (véase las figuras 9A y 9B).

Partículas fágicas totales

	PK15	PEP48 WT tet	PEP48 Schmid
Sobrenadante	3,01E+14	5,63E+13	2,52E+13
Fago purificado	2,54E+14	2,67E+13	7,86E+12
Entrada modificada	3,22E+11	8,21E+11	3,82E+11
Residuo modificado	1,91E+11	3,53E+11	2,42E+11
Salida modificada	1,47E+10	5,13E+09	8,18E+09
Salida no modificada	2,95E+10	9,64E+09	7,70E+09

- 5 Estos resultados confirman que el fago WT y el fago Schmid funcionan comparablemente en un protocolo de modificación, pudiéndose aislar números similares de fagos de cada etapa del procedimiento.

Los presentes inventores llevaron a cabo un segundo experimento en el que se obtuvieron títulos de fagos comparables. Los presentes inventores también compararon los títulos infectivos de los fagos obtenidos. Los presentes inventores encontraron que el fago Schmid era considerablemente menos infectivo que el fago de tipo silvestre, incluso en ausencia de modificación. Al modificarlo, se redujo la infectividad del fago Schmid comparado con el fago de tipo silvestre.

- 10

Títulos de partículas vs títulos infectivos por ml		Título		
		Partículas	Infectivo	Proporción
PK15	Inicial modificada	4,77E+11	5,62E+10	8,5
	Final modificada	5,41E+11	1,00E+10	54,1
	Final no modificada	6,13E+11	1,90E+10	32,2
PEP48 WT tet	Inicial modificada	2,71E+11	1,08E+10	25,2
	Final modificada	1,77E+11	1,40E+09	126,6
	Final no modificada	2,52E+11	5,22E+09	48,4
PEP48 Schmid	Inicial modificada	5,52E+11	1,38E+09	401,2
	Final modificada	2,62E+11	5,00E+07	5,2E+03
	Final no modificada	2,61E+11	4,75E+08	549,5

Conclusión

- 15 Los experimentos anteriores demuestran que el fago de tipo silvestre y el fago Schmid pueden utilizarse para expresar péptidos en bibliotecas fágicas. Los presentes inventores también mostraron que la infectividad del fago Schmid es considerablemente inferior a la del fago de tipo silvestre, tanto bajo condiciones modificadas como no modificadas.

Ejemplo 3

Modificación de fagos sobre resina

- 20 PK15 es un péptido que contiene tres cisteínas (H-ACSDRFRNCPADEALCG-NH₂), que, acoplado con TBMB, es un inhibidor específico y potente de la caliceína plasmática humana. Este péptido puede expresarse en forma de una fusión con la proteína del gen 3 del fago y, si resulta correctamente modificado por TBMB, dará como resultado un fago que puede unirse específicamente a la caliceína. La no modificación de PK15 sobre el fago o el entrecruzamiento del fago no resultarían en una señal específica de unión para la unión del fago a la caliceína.

- 25 Se utilizó resina de intercambio aniónico para capturar el fago, permitiendo un rápido y fácil cambio de los tampones a los que estaba expuesto el fago durante el procedimiento de modificación. El fago también se tituló para número de partículas e infectividad a fin de demostrar que el procedimiento de modificación no había hecho que el fago fuese significativamente menos infeccioso.

Materiales y métodos:

- 30 1. Se añadió 1 ml de NaHCO₃ 1 M a 50, 100 o 150 µl de una suspensión aproximadamente al 50% de una resina de intercambio aniónico fuerte para equilibrar la resina.
2. Cada muestra se centrifugó a 3.000 rpm en una microcentrífuga durante un minuto antes de separar cuidadosamente el sobrenadante.
- 35 3. Se añadió a cada muestra 1 ml de cultivo de durante la noche del que se había eliminado *E. coli* mediante centrifugación, que contenía el fago expresante de PK15, seguido de 10 µl de NaHCO₃ y 1 µl de TCEP 1 M. Se

añadió NaHCO₃ para elevar el pH de la solución a fin de permitir que el fago se uniese a la resina y el TCEP es un agente reductor. Las muestras se mezclaron mediante rotación durante 20 minutos.

4. Las muestras se centrifugaron tal como anteriormente y se separó cuidadosamente el sobrenadante.

5. Se añadió 1 ml de NaHCO₃ 20 mM, EDTA 5 mM que contenía TCEP 1 µM para resuspender la resina, eliminando simultáneamente mediante lavado la mayor parte de cualquier TCEP remanente antes de la adición de TBMB.

6. Las muestras se centrifugaron y se separó cuidadosamente el sobrenadante.

7. Se añadió a cada muestra 1 ml de acetonitrilo al 20% en NaHCO₃ 20 mM, EDTA 5 mM que contenía TBMB 60 µM. Las muestras se mezclaron mediante rotación durante 10 minutos.

10. 8. Las muestras se centrifugaron tal como anteriormente y se separó cuidadosamente el sobrenadante.

9. Se añadió a cada muestra 1 ml de NaHCO₃ 20 Mm y EDTA 5 mM.

10. Las muestras se centrifugaron tal como anteriormente y se separó cuidadosamente el sobrenadante.

11. Se añadieron 100 µl de citrato 50 mM, pH 5,0, y NaCl 1,5 M a cada muestra y las muestras se mezclaron durante 5 minutos en una plataforma de agitación.

15. 12. Cada muestra se centrifugó a 13.000 rpm en una microcentrífuga durante un minuto antes de separar cuidadosamente el sobrenadante y retenerlo. El sobrenadante se centrifugó nuevamente, para eliminar cualquier traza restante de la resina y se separó cuidadosamente el sobrenadante y se retuvo.

13. Se llevó a cabo la unión del fago a la calicreína.

20. El fago eluyó de la resina se unía específicamente a la calicreína, demostrando que el procedimiento de modificación había creado con éxito péptidos bicíclicos acoplados con TBMB sobre el fago (véase la figura 3).

Título de fago

Se compararon los títulos de partículas e infecciosos de las muestras a fin de comprobar si el procedimiento de modificación había 'dañado' el fago y convertido en menos infeccioso que antes de la modificación.

	Título total de fago por ml		
	Partícula	Infectivo	Proporción
50 µl de resina	3,0E+11	2,80E+10	10,5
100 µl de resina	2,9E+11	3,40E+10	8,6
150 µl de resina	2,6E+11	2,80E+10	9,1

25. El título de partículas aproximadamente 10 veces más alto que el título infeccioso es una proporción premodificación típica para fagos en los laboratorios de los presentes inventores al utilizar los procedimientos estándares descritos anteriormente. Por tanto, el procedimiento de modificación no había dañado significativamente el fago.

Ejemplo 4

Modificación de polipéptidos sobre fagos utilizando la separación magnética

30. Se describe la utilización de una estación de separación magnética para el aislamiento del fago que expresaba polipéptidos. Además, en el presente ejemplo, se proporciona una revisión del efecto de:

- Diferentes tampones de unión (es decir, solución de entrada de fago)
- Diferentes tampones de unión/lavado (es decir, tampón durante la modificación)
- Diferentes tampones de elución

35. Sobre la eficiencia y rendimiento del procedimiento de modificación magnética de TCEP/TBMB. El polipéptido utilizado era PK15, presentado sobre FdTet de tipo silvestre.

Materiales y métodos:

40. Se utilizó una colonia de *E. coli* que contenía FdTet PK15/WT que se había sembrado por estrías recientemente sobre una placa de agar, para inocular 25 ml de 2TY/tet o LB/tet y los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C bajo agitación a 250 rpm.

Se prepararon las soluciones siguientes:

Tampones de elución:

Solución de citrato = 100 mM (2x) → pH 2,0 (sin ajuste)

5 Porciones de 20 ml del tampón de citrato 100 mM se diluyeron 1-en-2 con agua y después se ajustó el pH (con NaOH) a:

- pH 3,5
- pH 4
- pH 5

10 Se suplementaron porciones de 10 ml de solución de cada pH con NaCl a

- 1 M
- 1,5 M
- 2 M

Tampones de unión/lavado/modificación:

15 Los tampones comparados fueron NH_4CO_3 y NaHCO_3 . La solución NaHCO_3 1M (50x) alcanzó un pH de 9,0 (sin ajuste) tampón de NaHCO_3 20 mM (utilizando la solución 1 M) y EDTA 5 mM que había alcanzado un pH de 9,0 (sin ajuste). El tampón de NaHCO_3 20 mM se desgasificó durante 1 h.

Las muestras que debían tratarse en tampón de NaHCO_3 se prepararon utilizando NaHCO_3 1 M.

Los dos cultivos de PK15 se trataron del modo siguiente:

- 20
- DO600 medidas: PK15 en 2TY = 1,95; PK15 en LB = 2,056
 - pH medido: PK15 en 2TY = pH 8,5; PK15 en LB = pH 7,5
 - Se añadió a los cultivos Tris 1 M, pH 8 (hasta una concentración final de 10 mM) para las muestras en tampón de NH_4CO_3 o se añadió NaHCO_3 1 M (hasta una concentración final de 20 mM) para las muestras en NaHCO_3 , y se midieron los pH:

25 PK15/2TY/Tris=pH 8

PK15/2TY/ NaHCO_3 =pH 9

PK15/LB/ NaHCO_3 =pH 8

Se prepararon las soluciones siguientes al pH especificado.

- | | |
|---|------|
| ◦ 1 ml de tampón de NH_4CO_3 /EDTA | pH 8 |
| ◦ 1 ml de tampón de NH_4CO_3 /EDTA + TCEP 1 mM | pH 7 |
| ◦ 1 ml de tampón de NH_4CO_3 /EDTA + TCEP 1 μM | pH 7 |
| ◦ 800 μl de tampón de NH_4CO_3 /EDTA + 199 μl de acetonitrilo + TBMB 60 μM | pH 7 |
| ◦ 1 ml de tampón de NaHCO_3 /EDTA | pH 8 |
| ◦ 1 ml de tampón de NaHCO_3 /EDTA + TCEP 1 mM | pH 7 |
| ◦ 1 ml de tampón de NaHCO_3 /EDTA + TCEP 1 μM | pH 7 |
| ◦ 800 μl de tampón de NaHCO_3 /EDTA + 199 μl de acetonitrilo + TBMB 60 μM | pH 7 |

30 Se llevó a cabo la separación magnética de la cromatografía, reteniendo las perlas o el sobrenadante, en su caso.

Parte A:

Para cada muestra, se enjuagaron 20 μl de perlas de intercambio iónico magnéticas en 1 ml de tampón de NH_4CO_3 /EDTA y se resuspendieron en 10 μl del mismo tampón. A continuación, se procesaron las muestras del modo siguiente:

35 A. 980 μl de solución de fago + 10 μl de perlas lavadas + 10 μl de Tris 1 M, pH 8

B. Las muestras se mezclaron durante 20 minutos antes de separar magnéticamente las perlas de la solución y se retiraron las perlas.

C. Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de NaHCO₃ o de NH₄CO₃/EDTA con 1 minuto de mezcla antes de capturar las perlas magnéticamente.

5 D. Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de NaHCO₃ o NH₄CO₃/EDTA + TCEP 1 mM con 20 minutos de mezcla antes de capturar las perlas magnéticamente. Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de NaHCO₃ o NH₄CO₃/EDTA buffer + tampón de TCEP 1 μM con 1 minuto de mezcla antes de capturar las perlas magnéticamente.

10 E. A continuación, se añadieron las perlas a 800 μl de tampón de NaHCO₃ o tampón de NH₄CO₃/EDTA + 200 μl de acetonitrilo/TBMB 300 μM (concentración final de TBMB: 60 μM) y se dejó que se mezclasen durante 30 minutos antes de capturar las perlas magnéticamente.

F. Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de NaHCO₃ o de NH₄CO₃/EDTA con 1 minuto de mezcla antes de capturar las perlas magnéticamente.

15 G. A continuación, se añadieron las perlas a 50 μl de tampón de elución de citrato 50 mM (pH 3,5/4/5; NaCl 1 M/1,5 M/2 M) durante 1 minuto bajo agitación.

H. Seguidamente las perlas se capturaron magnéticamente y se retuvo el sobrenadante.

Finalmente, se añadieron 10 μl de Tris 1 M, pH 8, a los 50 μl de eluido para neutralizarlo.

Muestras preparadas:

nº	Inicial (unión)		Tampón	Modificación	Elución	
	Medio	Fago		Tampón	pH	[NaCl]
1	2TY	Cultivo	Tris 10 mM pH 8	NH ₄ CO ₃ /EDTA	4	1,5
2	2TY	Sobrenadante	Tris 10 mM pH 8	NH ₄ CO ₃ /EDTA	4	1,5
3	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1,5
4	LB	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1,5
A	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1,5
B	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	3,5	1,5
C	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	5	1,5
D	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1
E	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	3,5	1
F	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	5	1
G	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	2
H	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	3,5	2
I	2TY	Cultivo	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	5	2

20 Se retiraron los eluidos de fago (en tampón citrato).

Con el fin de comprobar si cada tampón de elución diferente presentaba algún fago residual no eluido unido a las perlas, se llevó a cabo una segunda elución utilizando el mismo tampón de elución.

Las muestras se sometieron a ensayo mediante qPCR para el título de partículas. Se muestran los resultados en la figura 4.

25 Conclusiones:

- La naturaleza del medio de cultivo (2TY o LB) no afectó significativamente el título inicial de fago (la diferencia de 2 veces observada probablemente se encuentra dentro de la variabilidad del ensayo de qPCR).
- La naturaleza del tampón de unión (Tris o NaHCO₃) no afecta significativamente al número de fagos eluidos.
- La naturaleza del tampón de lavado/modificación no afecta significativamente al número de fagos eluidos.
- Para todos los tipos de entrada/lavado eluidos rutinariamente en tampón 1,5 M, pH 4, 30% a 40% del fago inicial eluyó tras la modificación.
- No se observaron tendencias claras con respecto a qué pH o [NaCl] era la óptima para la elución, aunque:
 - el tampón de elución de pH 3,5 generalmente no era bueno

30

◦ NaCl 2 M generalmente no era bueno

- Un tampón de elución que eluye eficientemente en la 1º elución generalmente eluye bien en la 2º elución (aunque puede esperarse que se retenga menos fago sobre las perlas después de la 1º elución).

5 Con el fin de comprobar la modificación de las muestras anteriormente indicadas, se cribó el fago eluido para la unión de la calicreína.

Se llevó a cabo un cribado de unión de la diana con las muestras de eluido obtenidas anteriormente, tal como se muestra en la figura 5. No eran apreciables tendencias claras, ni siquiera en la repetición de los ensayos.

Análisis de los tampones de elución

Se repitió el procedimiento de unión/elución y modificación con diferentes tampones de elución.

10 Se prepararon las muestras indicadas a continuación:

nº	Entrada (unión)			Modificación	Elución	
	Medio	Fago	Tampón	Tampón	pH	[NaCl]
2	2TY	Sobrenadante	Tris 10 mM pH 8	NH ₄ CO ₃ /EDTA	4	1,5
3	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1,5
4	LB	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1,5
A	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1,5
B	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	3,5	1,5
C	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	5	1,5
D	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	1
E	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	3,5	1
F	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	5	1
G	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	4	2
H	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	3,5	2
I	2TY	Sobrenadante	NaHCO ₃ 20 mM pH 9	NaHCO ₃ /EDTA	5	2

Conclusiones:

Se observó una tendencia entre eluidos procedentes de diferentes muestras iniciales:



15 Sin embargo, la diferencia entre ellas aparentemente no era significativa.

De manera similar, se observó una tendencia entre eluidos utilizando diferentes tampones de elución:

- pH 3,5 proporcionaba una elución reducida independientemente de [NaCl]
- pH 5 proporcionaba la mejor elución al utilizar NaCl 1,5 M o 2 M
- pH 4 proporcionaba una buena elución a menos concentración salina

20 pH 5 proporcionaba los mejores resultados, aunque debía utilizarse con una concentración salina elevada.

Ejemplo 5

Comparación entre los protocolos de modificación de fago magnéticos 'rápidos' y 'prolongados'

Se optimizó el procedimiento de modificación de fago a partir de un protocolo prolongado. En la presente memoria se comparan los resultados del protocolo prolongado con los de un protocolo acortado.

25 Se utilizó una colonia procedente de la placa estriada PK15/FdTet WT del Ejemplo 3, para inocular 25 ml de 2TY/tet. El cultivo se incubó durante la noche a 37°C, bajo agitación a 250 rpm.

Se llevaron a cabo protocolos prolongados y rápidos. Se ilustran en la figura 6.

El protocolo rápido es el siguiente.

- Enjuague de 20 µl de perlas de intercambio iónico magnéticas en 1 ml de tampón de NaHCO₃ 1 M y resuspensión en 10 µl del mismo tampón.
- 30

A. 1 ml de solución inicial (cultivo/perlas/TCEP), mezcla durante 20 minutos y captura de las perlas magnéticamente.

B. Lavado de las perlas en 1 ml de tampón de NaHCO₃/EDTA + TCEP 1 μM mediante la mezcla de las perlas con el tampón y recaptura inmediata de las perlas magnéticamente.

5 C. Mezcla de las perlas en el tampón de NaHCO₃/EDTA + (TBMB en ACN)

donde [ACN]_{final} = 20%; [TBMB]_{final} = 60 μM durante 10 minutos antes de la captura magnética de las perlas.

D. Lavado de las perlas en 1 ml de tampón de NaHCO₃/EDTA mediante la mezcla de las perlas con el tampón y recaptura magnética inmediata de las perlas.

10 E. Elución del fago respecto de las perlas mediante mezcla con 50 μl de citrato 50 mM, NaCl 1,5 M, pH 5, durante 1 minuto antes de capturar magnéticamente las perlas y retener el sobrenadante.

- Finalmente, se añadieron 10 μl de Tris 1 M, pH 8, a los 50 μl de eluido para neutralizarlo.

El protocolo prolongado es el siguiente:

Parte A:

15 • Enjuague de 20 μl de perlas de intercambio iónico magnéticas en 1 ml de tampón de NaHCO₃ 1 M y resuspensión en 10 μl del mismo tampón.

A. 980 μl de solución de fago + 10 μl de perlas lavadas + 10 μl de mezcla de NaHCO₃ 1 M durante 20 minutos y captura magnética de las perlas.

B. Lavado de las perlas en 1 ml de tampón de NaHCO₃/EDTA mediante la mezcla de las perlas con el tampón y recaptura magnética inmediata de las perlas.

20 C. Mezcla de las perlas en 1 ml de tampón de NaHCO₃/EDTA ± TCEP 1 mM durante 30 minutos y captura magnética de las perlas.

D. Lavado de las perlas en 1 ml de tampón de NaHCO₃/EDTA ± TCEP 1 μM mediante la mezcla de las perlas con el tampón y recaptura inmediata de las perlas magnéticamente.

25 E. Mezcla de las perlas en tampón de NaHCO₃/EDTA + (TBMB en ACN) donde [ACN]_{final}=20%; [TBMB]_{final} = 60 μM durante 30 minutos y captura magnética de las perlas.

F. Lavado de las perlas en 1 ml de tampón de NaHCO₃/EDTA mediante la mezcla de las perlas con el tampón y recaptura magnética inmediata de las perlas.

G. Elución del fago respecto de las perlas mediante mezcla con 50 μl de citrato 50 mM, NaCl 1,5 M, pH 5, durante 1 minuto antes de capturar magnéticamente las perlas y retener el sobrenadante.

30 • Finalmente, se añadieron 10 μl de Tris 1 M, pH 8, a los 50 μl de eluido para neutralizarlo.

Se incluyeron muestras en las que TCEP y TBMB habían sido omitidos ('no modificados').

El título infectivo de las muestras de salida y de entrada (sobrenadante de cultivo) se sometieron a ensayo del modo siguiente:

35 • Se cultivaron *E. coli* HB2151 y se dividieron en alícuotas en 2YT hasta DO₆₀₀ ≈ 0,5. Esto representa ~2,5x10⁸ células/ml

- Las muestras de fagos se diluyeron 1 en 1.000 en 2YT;

- se añadió 1 μl de muestra diluida a 1 ml de HB2151 (2,5x10⁸ células)

- La muestra se incubó durante 1 h a 37°C bajo agitación a 250 rpm;

- se prepararon 7x diluciones en serie de 10 veces (puro → 10⁻⁷) en 2YT;

40 • se aplicó una mancha de 20 μl sobre placas de agar con tetraciclina secas y se incubaron durante la noche a 37°C.

- Las muestras se analizaron mediante qPCR. Se muestran los resultados en la figura 7A.

Se llevó a cabo un ensayo de unión a calicreína en las muestras con el fin de comprobar que se había producido la ciclización. Se muestran los resultados en la figura 7B.

Conclusiones:

- 5 • Los protocolos 'Rápido' y 'Prolongado' producen fago modificado que genera niveles similares de señal en un ensayo de unión a calicreína.
- La utilización del protocolo 'Prolongado' resulta más dañina a la infectividad del fago que el protocolo 'Rápido'. El protocolo rápido retuvo ~1-en-10 fagos infectivos de los fagos iniciales; el protocolo prolongado redujo la infectividad a 1-en-100.
- 10 • Parte del daño en los fagos observado en el protocolo prolongado puede atribuirse al tiempo de manipulación más largo (es decir, la muestra no modificada del protocolo prolongado mostraba cierta pérdida de infectividad).

Globalmente, la utilización del nuevo procedimiento de modificación de fago 'Rápido' conduce a una buena ciclización sin pérdida de infectividad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para conjugar un péptido presentado sobre un sistema de presentación en fagos con un andamiaje molecular, que comprende las etapas de:
 - (a) combinar polipéptidos presentados sobre un sistema de presentación en fagos con una resina de purificación tal que el sistema de presentación en fagos se une a la resina, y tratar el sistema de presentación en fagos unido con un agente reductor,
 - (b) exponer el sistema de presentación en fagos unido ante un andamiaje molecular,
 - (c) separar el andamiaje molecular que no ha reaccionado del sistema de presentación en fagos unido, y
 - (d) eluir el sistema de presentación en fagos de la resina de purificación.
2. Un método según la reivindicación 1, donde el fago es un fago de tipo silvestre.
3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (a) va seguida de una etapa de lavado antes de la adición del andamiaje molecular.
4. Un método según la reivindicación 3, donde el sistema de presentación en fagos se lava en una solución diluida de agente reductor.
5. Un método según la reivindicación 4, donde la solución de lavado comprende además un agente quelante.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el agente reductor es TCEP.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el andamiaje es TBMB.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el andamiaje molecular se añade en presencia de acetonitrilo acuoso.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la resina es una resina de intercambio aniónico.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la resina es magnética.
11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una o ambas etapas (a) y (b) se llevan a cabo a temperatura ambiente (25°C).
12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (a) se lleva a cabo durante 20 minutos.
13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (b) se lleva a cabo durante 10 minutos.

Figura 1

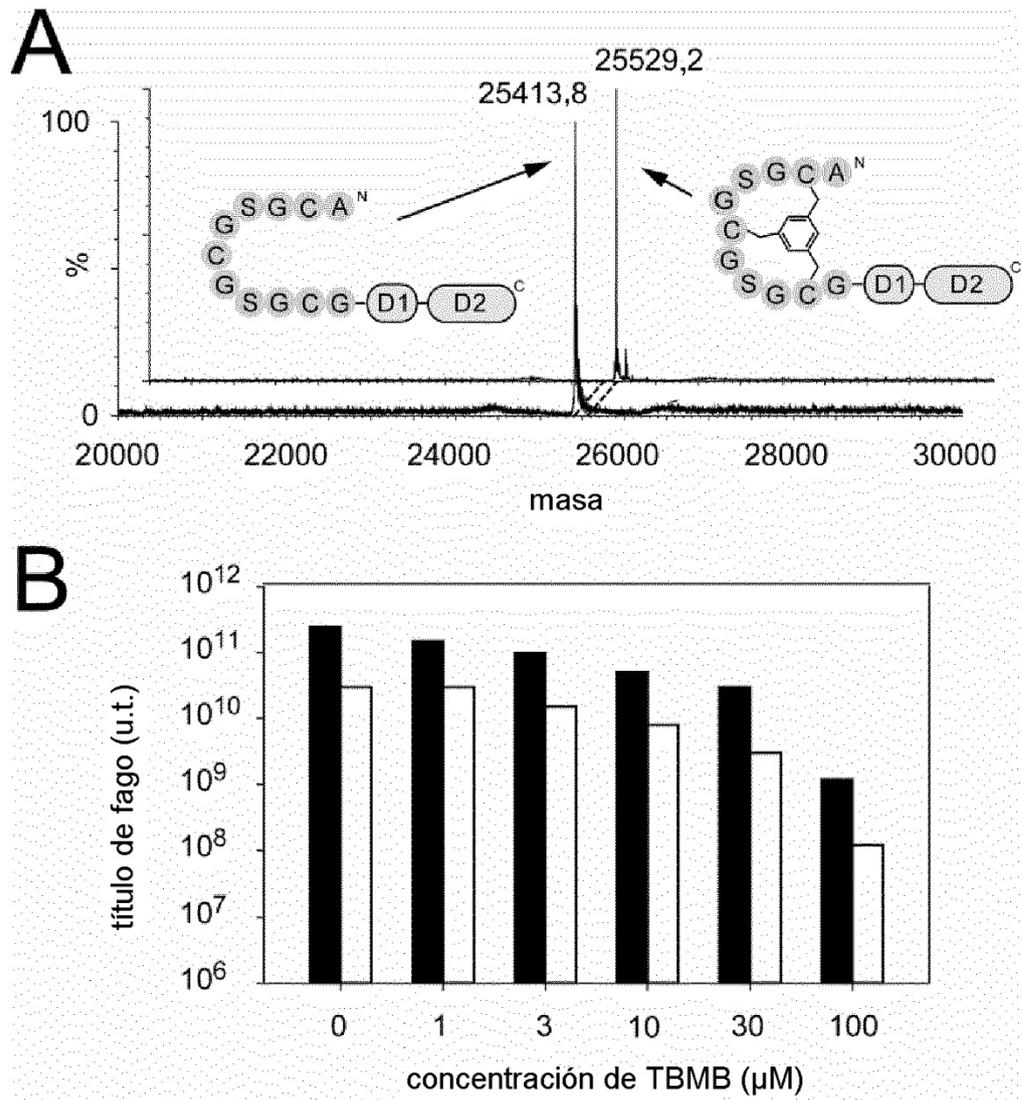


Figura 2

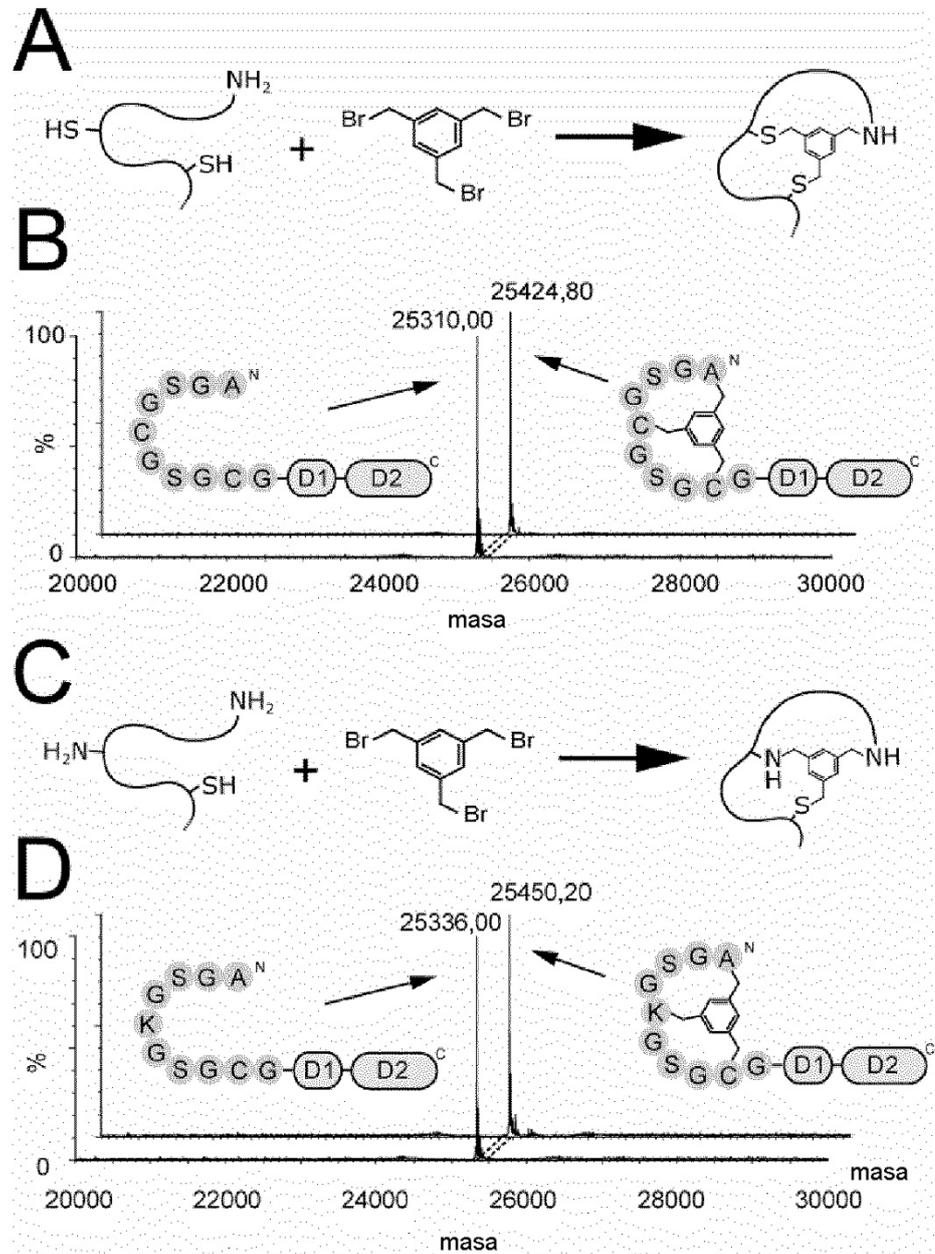


Figura 3

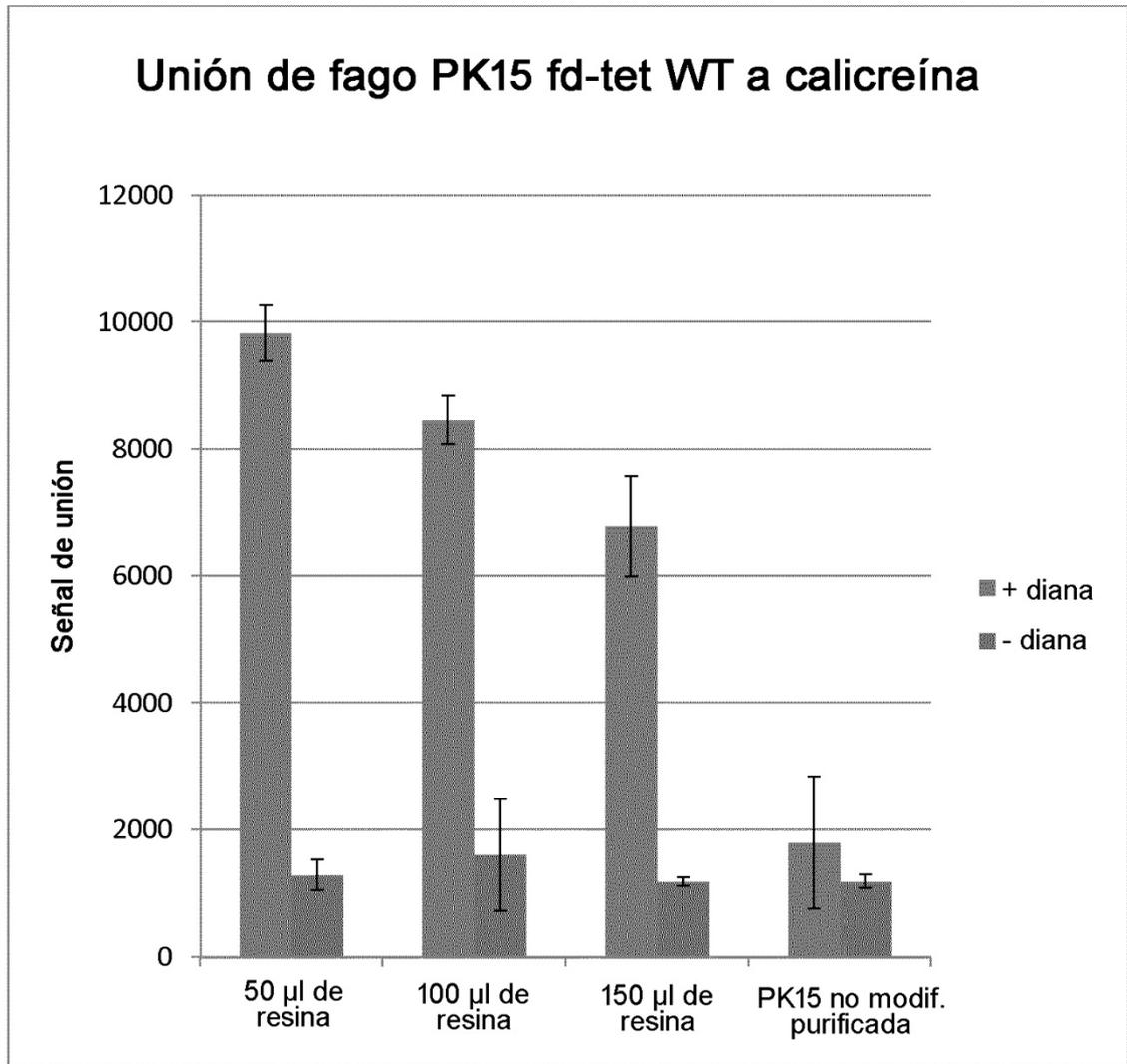
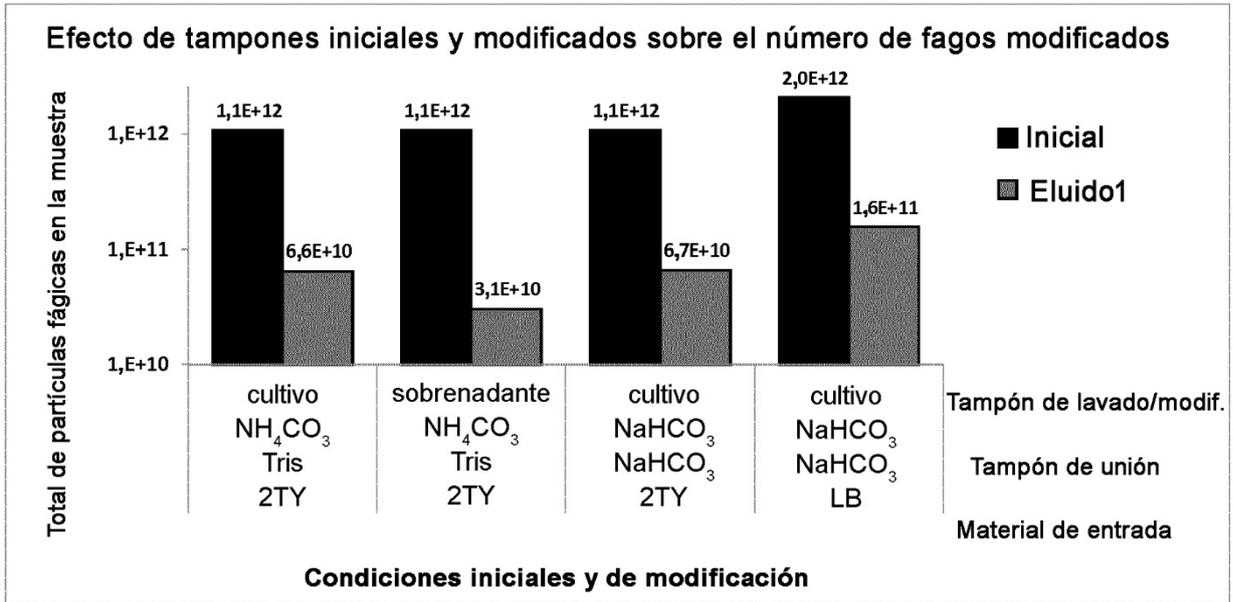


Figura 4

A



B

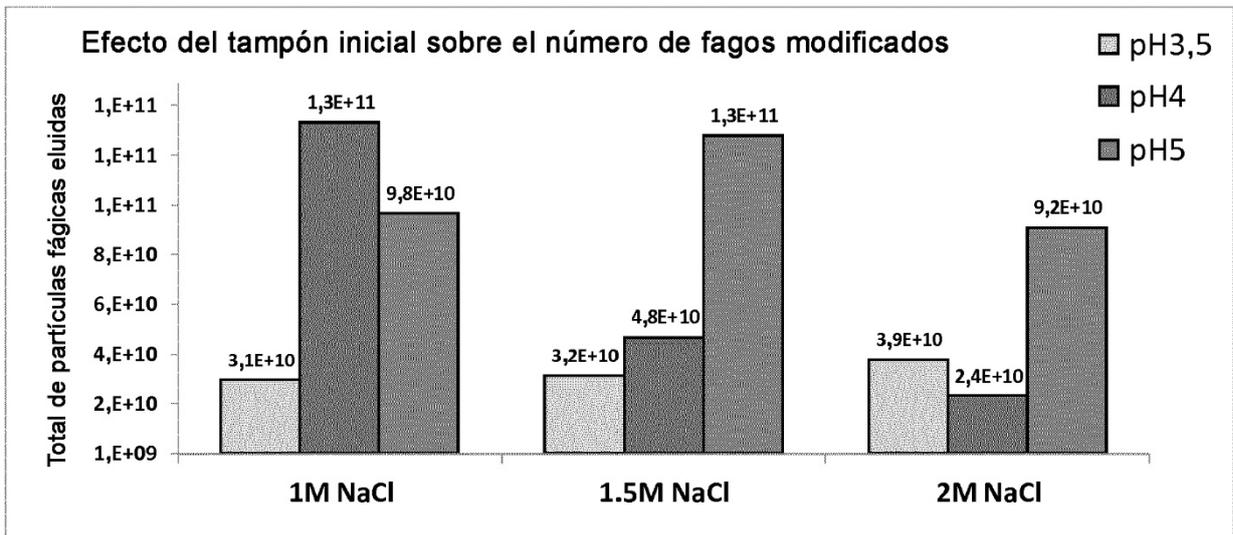


Figura 4C

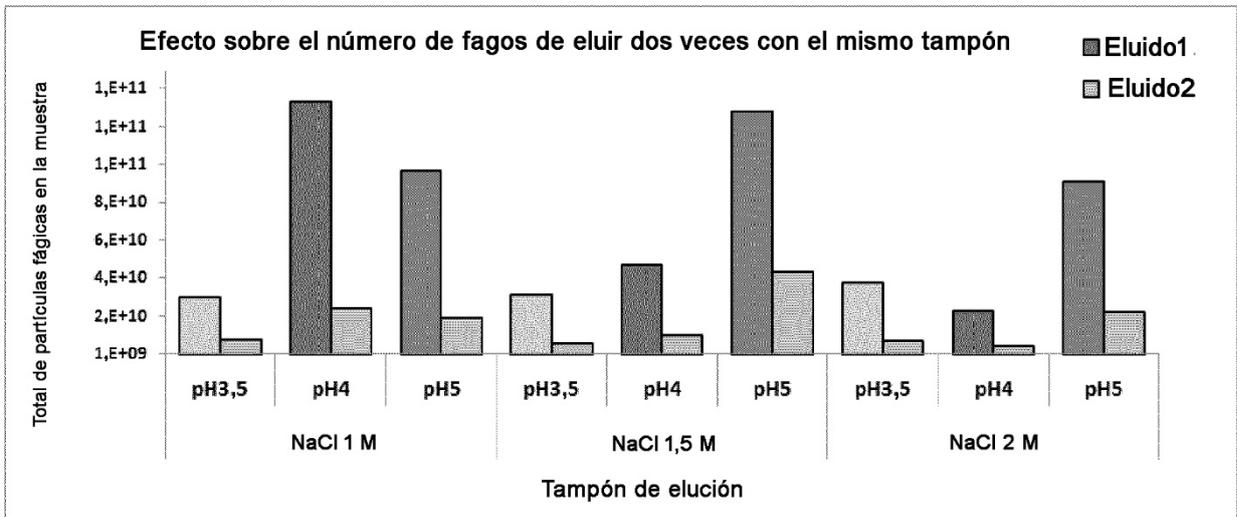


Figura 5

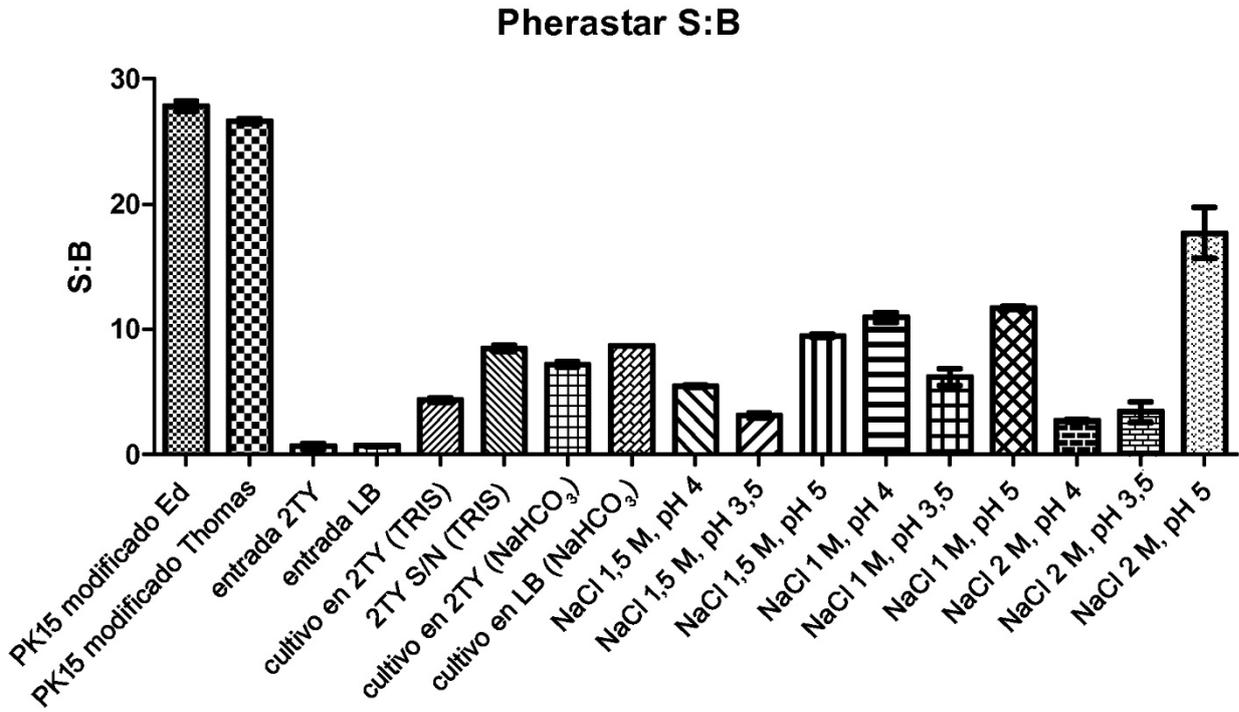
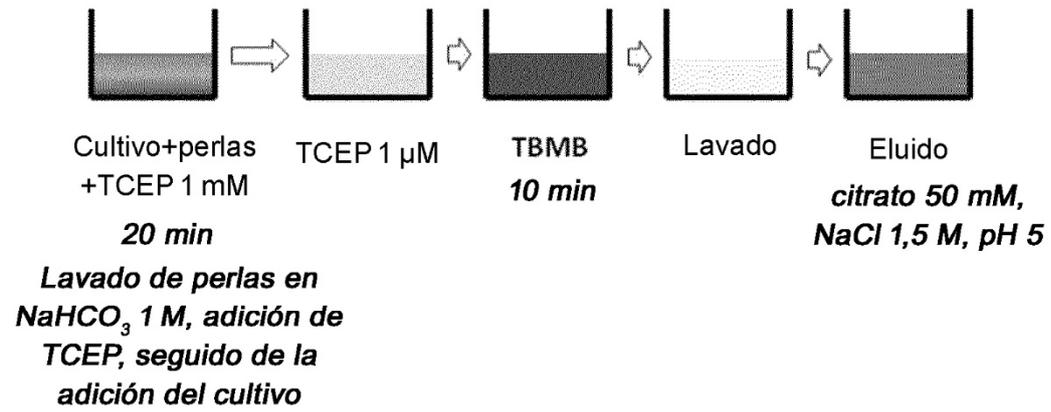


Figura 6

A: 'Rápido':



B: 'Prolongado':

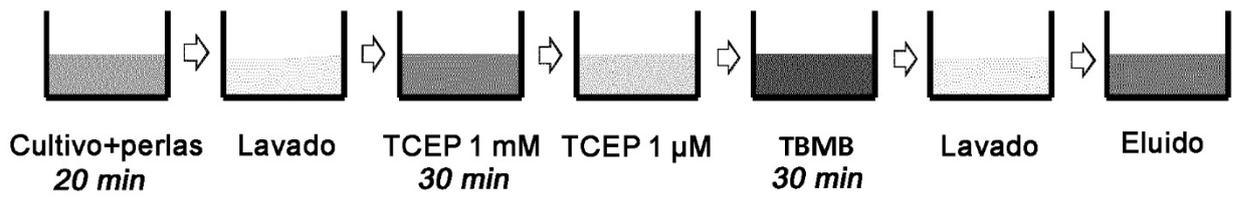
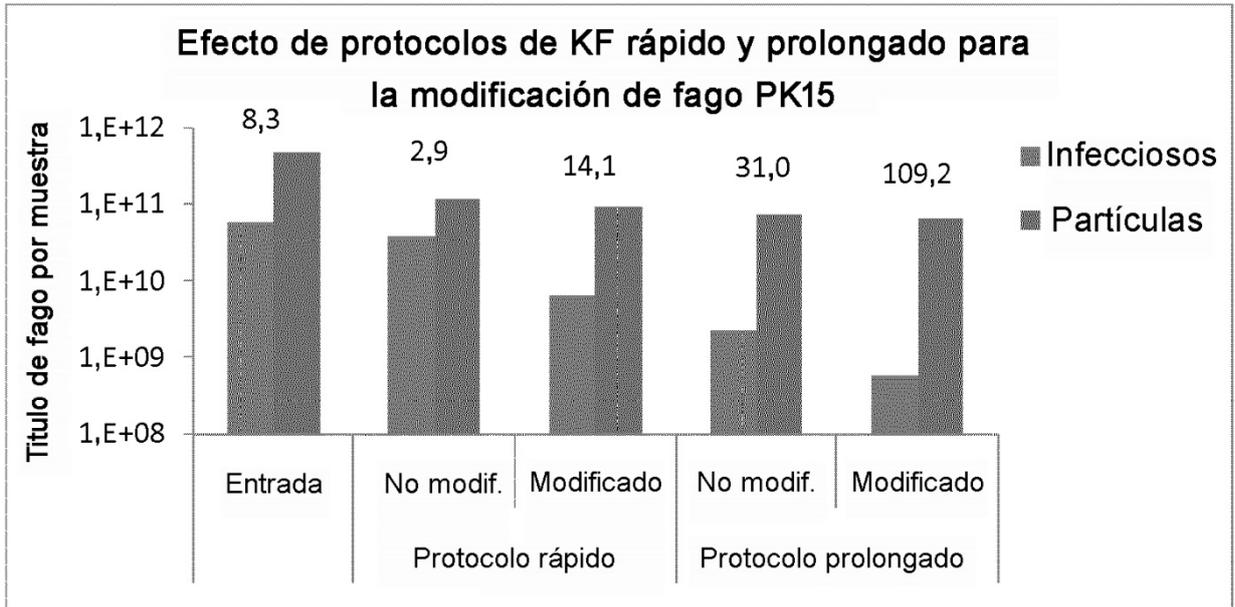


Figura 7A



B

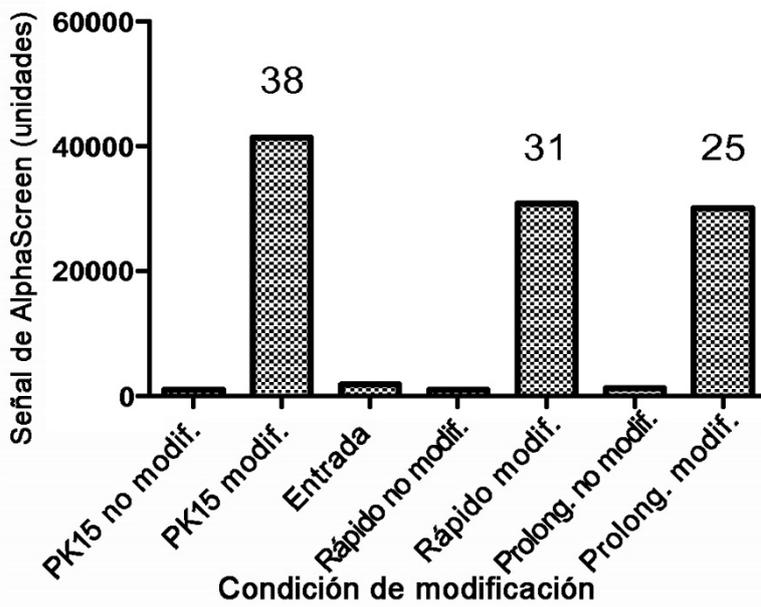


Figura 8

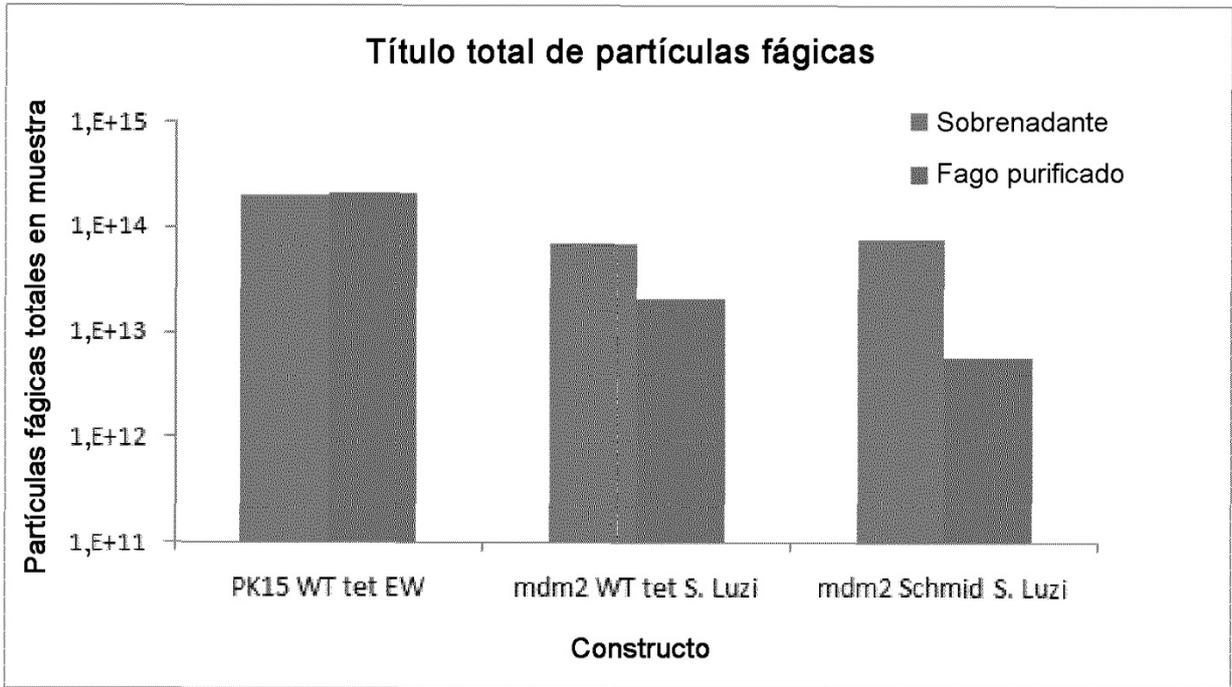


Figura 9A

Título de partículas por ml durante prep. y modificación

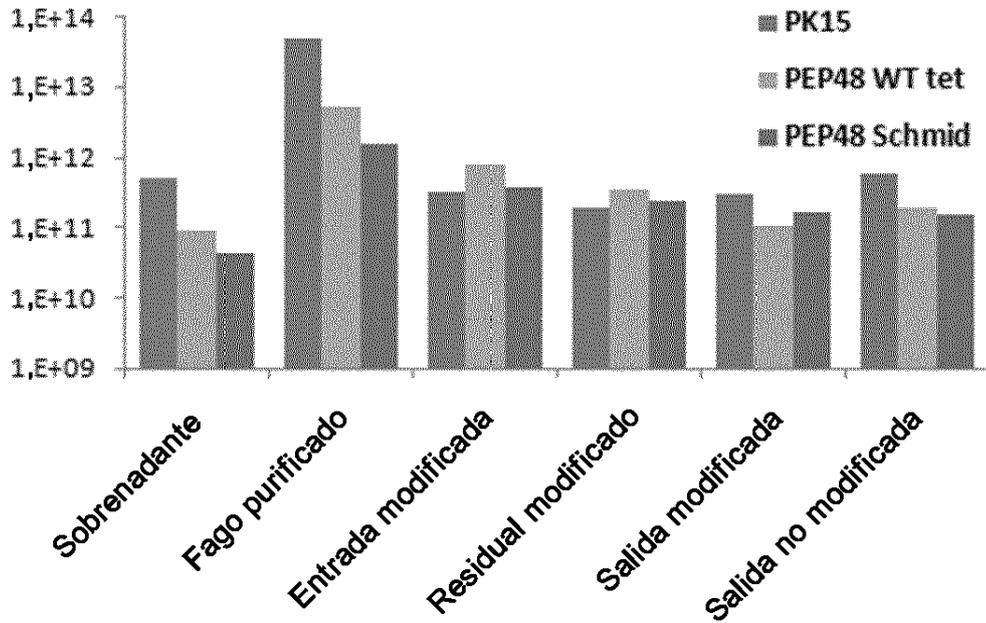


Figura 9B

Partículas fágicas totales durante prep. y modificación

