

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 906**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2018** **PCT/EP2018/080210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.05.2019** **WO19086681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2018** **E 18804242 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024** **EP 3704244**

54 Título: **Construido de vector**

30 Prioridad:

03.11.2017 GB 201718294

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

31.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LØSET, GEIR ÅGE;
FRIGSTAD, TERJE;
BERGE-SEIDL, SEBASTIAN;
NILSSEN, NICOLAY RUSTAD y
SANDLIE, INGER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 984 906 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

Construido de vector

5 La presente invención se refiere a la exposición fágica y, en particular, a partículas fágicas fluorescentes y vectores de ácidos nucleicos para la producción de partículas fágicas fluorescentes. Más particularmente, la presente invención se refiere a constructos de vector en los que se fusiona una secuencia codificante de un fluoróforo con una secuencia codificante de la proteína de cubierta fágica pVIII.

10 A lo largo de las últimas tres décadas, la exposición fágica se ha convertido en un método potente y eficiente para la identificación y evolución de nuevas proteínas de unión. Aunque existen tecnologías combinatoriales competidoras, ninguna muestra el alto grado de versatilidad en combinación con la facilidad de uso. Sin embargo, todavía es un reto el cribado para el fenotipo deseado tras la selección (en inglés, "panning") de los fagos, y no está garantizado que se identifiquen los ligantes óptimos. La selección en tiempo real, como la ofrecida por las tecnologías combinatoriales celulares compatibles con la citometría de flujo, tales como la exposición en levaduras, presenta una ventaja significativa, ya que los ligandos marcados fluorescentemente y la separación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) separa eficientemente los ligantes de los no ligantes de una manera cuantitativa en combinación con su recuperación (Boder y Wittrup, 1997, Nat. Biotechnol., 15, 553-557, y Feldhaus et al., 2003, Nat. Biotechnol., 21, 163-170).

20 Todavía no se han integrado métodos eficientes basados en FACS con la exposición fágica, por varios motivos: 1) la partícula fágica es excesivamente pequeña para detectarse por tamaño (dispersión directa y lateral) en el flujo; de esta manera, se requiere un marcaje fluorescente directo o una visualización indirecta, tal como mediante anticuerpos antifago marcados, lo que limita significativamente la sensibilidad y utilidad del método (Bowley et al., 2009, PNAS 106:1380-1385), 2) FACS requiere una partícula física recuperable; de esta manera, debido a que una partícula fágica por sí sola es excesivamente pequeña, la diana debe expresarse sobre una superficie celular, o inmovilizarse sobre una fase sólida, tal como microesferas, 3) el marcaje fluorescente directo del fago mediante acoplamiento químico puede perturbar la unión de la diana cuando hay grupos reactivos libres en o próximos al sitio de unión, o introduce impedimentos estéricos a la unión de antígenos, 4) la detección de anticuerpos requiere etapas adicionales de incubación y lavado que conducen a la posible pérdida de clones y reducen la eficiencia de la selección.

De esta manera, la integración de un módulo inherente de detección fluorescente en la plataforma fágica mejoraría significativamente la capacidad de utilizar métodos basados en FACS, así como proporcionaría una herramienta muy útil para otros tipos de ensayo basados en la detección mediante fluorescencia.

35 La exposición funcional de proteínas fluorescentes sobre la superficie de partículas fágicas se ha conseguido anteriormente. Por ejemplo, Velappan et al. (Nucleic Acids Research, 38(4):e22, 2010) han mostrado que algunas formas de GFP pueden expresarse en forma de una fusión con las proteínas de cubierta fágica pIX o pIII, aunque los mejores constructos no presentaban una fusión genética directa entre el fluoróforo y la proteína de cubierta fágica, sino que por el contrario utilizaban una disposición de hélice arrollada para unir el fluoróforo a la proteína de cubierta fágica de una manera post-traducciona indirecta, en la que cada componente está codificado y se expresa en forma de componentes individuales separados. Además, Speck et al. (Protein Engineering, Design & Selection: PEDS, 24, 473-484, 2011) han mostrado que GFP y algunos derivados de GFP pueden expresarse en forma de una fusión directa con una forma truncada (solo dominio C-terminal) de la proteína de cubierta fágica pIII en un sistema de fagémido.

45 El documento n.º WO 2010/104596 se refiere a ligandos de unión con fluorescencia intrínseca (denominados "fluorocuerpos"), bibliotecas de fluorocuerpos y métodos de preparación de fluorocuerpos.

50 Wang et al. (Molecular Pharmaceutics, 2011, 8(5), 1720-1728) se refiere al mecanismo de direccionamiento de nanoportadores modificados con proteína de fusión fágica.

La pVIII es la proteína de cubierta (cápside) principal en los fagos filamentosos y, de esta manera, la fusión de fluoróforos a la proteína de cubierta pVIII es potencialmente ventajosa debido a su elevado número de copia por partícula fágica, y porque no interfiere con la exposición de la punta en ninguna de las restantes cuatro proteínas de cápside. Sin embargo, los informes sobre las fusiones basadas en la exposición fágica clásica de moléculas heterólogas con la proteína de cubierta pVIII están restringidos a la exposición de péptidos cortos.

60 Además, tal como se ha comentado anteriormente, la exposición fágica funcional de fluoróforos utilizando técnicas clásicas de exposición fágica puede ser problemática. Un motivo para ello es que las proteínas fluoróforos son bastante sensibles y normalmente se expresan y pliegan en el citoplasma para ser funcionales, lo que puede presentar problemas en términos de conseguir la transferencia de las proteínas de fusión de proteínas de cubierta fágica-fluoróforo expresadas al periplasma y la exposición de fluoróforos funcionales en la superficie fágica (DeLisa et al., J. Biol. Chem., 277 (33), 29825-29831, 2002).

Las técnicas actuales para resolver dicha cuestión implican la utilización de anticuerpos anti-pVIII marcados fluorescentemente, que a su vez pueden utilizarse para marcar fluorescentemente las partículas fágicas, que entonces pueden detectarse utilizando técnicas estándares, p. ej., mediante citometría de flujo o tinción fluorescente.

Más recientemente, Hess et al., 2012 (Bioconjugate Chemistry, 23:1478-1487), han superado algunos de dichos problemas mediante la demostración de la fusión de GFP en una proteína de cubierta de pVIII fágica utilizando una técnica post-traducciona, en la que se utiliza un enzima sortasa para conjugar las moléculas de GFP a las moléculas de pVIII presentes sobre la superficie de partículas fágicas.

Lo anterior se ha conseguido mediante la utilización de técnicas estándares de exposición fágica para obtener partículas fágicas que expresan proteínas de cubierta pVIII con una inserción de péptido corto que puede ser reconocido por el enzima sortasa. Esta inserción de péptido seguidamente puede someterse a tecnología estándar de sortasa con el fin de unir post-traduccionalmente la proteína de cubierta pVIII modificada sobre la superficie del fago a moléculas de GFP obtenidas de fuentes estándares.

De esta manera, aunque Hess et al. (*supra*) proporcionan partículas fágicas en las que las proteínas pVIII están fusionadas con fluoróforos GFP, no se lleva a cabo mediante técnicas clásicas de exposición fágica, en las que habría una fusión genética dentro de la partícula fágica entre una secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína de cubierta pVIII y una secuencia codificante del fluoróforo, de manera que se produciría una proteína de fusión. Ello también significa que no existe ningún vínculo genotipo-fenotipo en el sistema de Hess, lo que resulta desventajoso para las tecnologías de cribado, en las que una característica importante del enfoque clásico de exposición fágica es que una partícula fágica seleccionada que expone una proteína de interés (p. ej., una proteína que se une a un ligando diana) contiene el material genético codificante para dicha proteína de interés expuesta, que seguidamente puede obtenerse y analizarse o manipularse adicionalmente.

En la presente invención, inesperadamente y no según las expectativas de las enseñanzas de la técnica anterior, tal como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores han encontrado que pueden exponerse proteínas fluorescentes sobre las partículas fágicas en forma de una fusión genética con la proteína de cubierta fágica pVIII. Ello se ha conseguido mediante la provisión de un constructo de vector que combina la utilización de la ruta secretora Tat de *E. coli* con una proteína de fusión de fluoróforo-pVIII. Dichos vectores permiten ventajosamente la producción de partículas fágicas que exponen proteínas fluorescentes funcionales y detectables. En otras palabras, las partículas fágicas son intrínsecamente (o inherentemente) fluorescentes.

Los inventores también han mostrado que dichos vectores pueden utilizarse para incorporar una fusión de una segunda proteína de interés (PDI) con una proteína de cubierta fágica alternativa (no pVIII) con el fin de conseguir la exposición en superficie simultáneamente de tanto la proteína de fusión fluoróforo-pVIII y la proteína de interés fusionada con otra proteína de cubierta. En otras palabras, los inventores han demostrado en la presente memoria la generación de vectores y partículas fágicas tanto con capacidad de fluorescencia intrínseca y otra capacidad proporcionada por la PDI, p. ej., actividad de unión a una diana. De esta manera, dicho sistema fágico fluorescente de vectores y fagos producidos utilizando los vectores (también denominados en la presente memoria "fluorofagos") puede utilizarse ventajosamente para la selección y cribado con el fin de combinar las ventajas y facilidad del cribado fluorescente con la capacidad de investigar inmediata y fácilmente una PDI seleccionada utilizando el vínculo fenotipo-genotipo de la exposición fágica clásica. Este sistema fágico fluorescente posee usos en ensayos no FACS, ya que por sí mismo es directamente compatible con los enfoques clásicos de cribado basdos en placas de microtitulación, realizados tradicionalmente como ensayos de inmunosorción ligada en enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), o similares, que ahora podrían simplificarse y basarse alternativamente en mediciones cuantitativas de fluorescencia, p. ej. mediante FLISA (por sus siglas en inglés, ensayo de inmunosorción ligada a fluorescencia). Se describen otros usos en otros sitios de la presente memoria.

Además, los inventores han mostrado que aprovechando la capacidad de disponer ahora de una proteína de fusión genética como módulo de detección como una parte inherente del sistema de exposición fágica, también puede utilizarse la evolución molecular combinatorial para optimizar y mejorar la proteína de fusión. Ello se llevó a cabo mediante aleatorización de la secuencia codificante del fluoróforo y partes de pVIII, seguido del cribado fenotípico en FACS para una señal incrementada respecto a la del constructo parental. Ello permitió identificar una nueva proteína de fusión mutante que incrementaba la señal obtenida más allá de lo observado con el constructo parental. El efecto aparentemente se debe a una mejor adaptación de la proteína heteróloga al huésped productor *E. coli*, de manera que el resultado neto es un incremento del pool de proteína de fusión funcional, lo que se traduce tanto en un incremento de la señal fluorescente de la célula productora, como también de las partículas fágicas producidas por esta célula. Además, los inventores han mostrado que la sobreexpresión del transportador Tat en las células huésped de *E. coli* puede mejorar significativamente la señal fluorescente.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención proporciona un constructo de vector que comprende los componentes siguientes:

- (i) una secuencia codificante de un péptido de señal que dirige las proteínas a la ruta secretora Tat, y

- (ii) una secuencia codificante de un fluoróforo fusionado con una secuencia codificante de la proteína de cubierta fágica pVIII.

Los vectores de la invención son vectores de expresión o constructos de expresión, es decir, generalmente comprenden secuencias de ácidos nucleicos que permiten la expresión (síntesis proteica) en una célula huésped apropiada de componentes proteicos codificados que se desean.

Tal como se ha descrito de manera general anteriormente, la presente invención se refiere al campo de la exposición fágica. De esta manera, los vectores de la invención pueden ser vectores fágicos o vectores fagémicos (plásmidos), la construcción y componentes básicos de los cuales serán bien conocidos por el experto en la materia, y pueden seleccionarse con el fin de conseguir la expresión de proteínas fágicas y el empaquetamiento de partículas fágicas en una célula huésped apropiada de manera que las proteínas heterólogas o exógenas fusionadas con las diversas proteínas de cubierta fágica se exponen sobre la superficie de la partícula fágica.

De esta manera, al utilizar los vectores de la invención para transformar una célula huésped apropiada, tal como una cepa de *E. coli* apropiada, se producen partículas fágicas que contienen varias moléculas de fluoróforo funcionales fusionadas con la proteína de cubierta fágica pVIII y que están expuestas en la superficie de la partícula fágica, con las secuencias de vector u otras secuencias de ácidos nucleicos codificantes de los diversos componentes fágicos del genoma fágica contenido dentro de la partícula fágica. Dicho fluoróforo funcional expuesto sobre la superficie del fago puede detectarse mediante técnicas convencionales, tales como la tinción fluorescente (detectable mediante, por ejemplo, microscopía fluorescente o citometría de flujo, o un lector o detector de fluorescencia, p. ej., un lector o escáner de placas o un luminómetro).

La presente invención se extiende a secuencias de ácidos nucleicos o moléculas de ácidos nucleicos que pueden formar parte de los vectores de la invención. De esta manera, otro aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico que comprende los componentes siguientes:

- (i) una secuencia codificante de un péptido de señal que dirige proteínas a la ruta secretoria Tat, y
(ii) una secuencia codificante de un fluoróforo fusionado a una secuencia codificante de la proteína de cubierta fágica pVIII.

La presente invención proporciona, además, fagos o partículas fágicas que comprenden los vectores o moléculas de ácidos nucleicos de la invención y expresan una proteína de fusión de fluoróforo-pVIII sobre la superficie. Dichos fagos o partículas fágicas pueden ser de cualquier fago filamentoso. Son ejemplos preferentes los fagos de enterobacterias, por ejemplo los fagos M13, fd y f1.

De esta manera, los vectores de la presente invención comprenden una secuencia codificante de un péptido de señal. Este péptido de señal (o secuencia de señal, o secuencia líder, o péptido líder periplásmico, o secuencia líder periplásmica) puede ser cualquier secuencia apropiada (secuencia de aminoácidos) que dirija o direcciona proteínas a la ruta de exportación o secreción "Twin-Arginine Translocation" (Tat), p. ej., apuntando o direccionando la proteína al transportador Tat. Dichos péptidos de señal también se denominan en la presente memoria "péptidos de señal de Tat". En los vectores de la invención, esta secuencia codificante del péptido de señal está operablemente ligada a la secuencia codificante de la proteína de fusión fluoróforo-pVIII (una proteína fluoróforo fusionada con una proteína pVIII) y, de esta manera, dirige la proteína (la proteína de fusión fluoróforo-pVIII) a la ruta secretoria Tat.

La ruta Tat es una de varias rutas de traslocación o secretorias presentes en las células huésped bacterianas tales como *E. coli*. En esta ruta, la proteína se pliega bajo las condiciones reductoras del citoplasma previamente a la traslocación de la proteína totalmente plegada a través de la membrana interna hasta el periplasma. Al llegar al periplasma, el péptido de señal seguidamente es extraído por una peptidasa de señal apropiada. Otras rutas de traslocación o secretorias conocidas en bacterias gram-negativas, tales como *E. coli*, que participan en la traslocación de proteínas del compartimiento citosólico al periplásmico son la ruta SEC dependiente de partículas de reconocimiento de señal (SRP, por sus siglas en inglés), la ruta secretoria (Sec) clásica o la ruta dependiente de YidC (Baneyx, 2004, Nat. Biotechnol. 22:1399-1408). En contraste con la ruta Tat, las rutas SEC transportan proteínas no plegadas a través de la membrana interna hasta el periplasma mediante un mecanismo de trenzado, mientras que el transporte mediado por YidC también puede involucrar el transporte por lo menos parcialmente plegado utilizando el mecanismo de la flipasa (Kumazaki et al., 2014, Nature 509:516-520).

Las secuencias de señal o péptidos de señal para la ruta Tat son bien conocidos por el experto en la materia y puede utilizarse cualquiera de ellos, o en efecto derivados o variantes de los mismos que muestran capacidad conservada o mejorada de dirigir proteínas a la ruta Tat. En efecto, el nombre de la ruta Tat (en inglés, "Twin-Arginine Translocation") se refiere a un motivo líder de doble arginina altamente conservado (S/TRRXFLK, SEC ID n.º 33) que se encuentra en la región N-terminal de proteínas destinadas al transporte por la ruta Tat. En esta secuencia, X puede ser cualquier aminoácido, preferentemente cualquier aminoácido polar. De esta manera, esta sería una secuencia de ejemplo que podría formar parte del péptido de señal en los vectores de la invención.

Un ejemplo preferente sería la secuencia de señal de trimetilamina N-óxidoreductasa (Tor A) de *E. coli* o un derivado (o variante) de la misma que presenta una capacidad conservada o mejorada (p. ej., un mutante de ganancia de función) respecto a la secuencia inicial para exportar proteínas por la ruta Tat. Son derivados de ejemplo y preferentes, por ejemplo, los indicados en DeLisa et al. (J. Biol. Chem., 277 (33), 29825-29831, 2002).

La secuencia completa de la secuencia líder T o A de tipo salvaje es la siguiente (MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT, SEC ID n.º 32). Esta secuencia de péptido de señal o cualquier otra secuencia de péptido de señal que comparte el elemento TorA para dirigir la proteína de la que es una parte al transportador Tat puede utilizarse en los vectores de la presente invención (por ejemplo, tal como se describe en la entrada interpro IPR006311 o en Bendtsen et al., 2005, BMC Bioinformatics 6:167). En la secuencia líder de tipo salvaje de Tor A, anteriormente, el motivo de consenso de doble arginina está subrayado y los péptidos de señal que comprenden esta secuencia pueden utilizarse en los vectores de la invención, siempre que se conserve ese direccionamiento a la ruta Tat.

Un péptido de señal particularmente preferente para la utilización en la presente invención es el péptido de señal Tor AB7 (MNNNDLFQTSRQRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT, SEC ID n.º 2) que ha sido modificado para un direccionamiento periplásmico mejorado de las proteínas por la ruta Tat en comparación con el péptido de señal TorA de tipo salvaje. El péptido de señal Tor AB7 presenta o comprende la secuencia TSRQRFLA (SEC ID n.º 34), en la que los residuos subrayados son los residuos que difieren de la secuencia de señal TorA de tipo salvaje, y los péptidos de señal que comprenden esta secuencia resultan particularmente preferentes siempre que se conserve el direccionamiento a la ruta Tat.

Alternativamente, también pueden utilizarse los mutantes Tor A, B6, E2, F1, F11 o H2 tal como se dan a conocer en la Tabla II de DeLisa et al., *supra*.

De esta manera, un péptido de señal preferente para la utilización en la presente invención es el péptido de señal Tor AB6 (MNNNDLFQTSRRRLLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT, SEC ID n.º 35), que ha sido modificado para un direccionamiento periplásmico mejorado de las proteínas por la ruta Tat en comparación con el péptido de señal TorA de tipo salvaje. El péptido de señal Tor AB6 presenta o comprende la secuencia TSRRRLLA, SEC ID n.º 36, en la que los residuos subrayados son los residuos que difieren de la secuencia de señal de TorA de tipo salvaje, y los péptidos de señal que comprenden esta secuencia resultan particularmente preferentes siempre que se conserve el direccionamiento a la ruta Tat.

De esta manera, un péptido de señal preferente para la utilización en la presente invención es el péptido de señal Tor AE2 (MNNNDIFQASRRRFLAQPGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT, SEC ID n.º 37), que ha sido modificado para un direccionamiento periplásmico mejorado de las proteínas por la ruta Tat en comparación con el péptido de señal TorA de tipo salvaje. El péptido de señal Tor AE2 presenta o comprende la secuencia IFQASRRRFLAQ, SEC ID n.º 38, en la que los residuos subrayados son los residuos que difieren del péptido de señal TorA de tipo salvaje, y los péptidos de señal que comprenden esta secuencia resultan particularmente preferentes siempre que se conserve el direccionamiento a la ruta Tat.

De esta manera, un péptido de señal preferente para la utilización en la presente invención es el péptido de señal Tor AF1 (MNNNELFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT, SEC ID n.º 39), que ha sido modificado para un direccionamiento periplásmico mejorado de las proteínas por la ruta Tat en comparación con el péptido de señal TorA de tipo salvaje. El péptido de señal Tor AF1 presenta o comprende la secuencia ELFQASRRRFLA, SEC ID n.º 40, en la que los residuos subrayados son los residuos que difieren de la secuencia de señal de TorA de tipo salvaje, y los péptidos de señal que comprenden esta secuencia resultan particularmente preferentes siempre que se conserve el direccionamiento a la ruta Tat.

De esta manera, un péptido de señal preferente para la utilización en la presente invención es el péptido de señal Tor AF11 (MNNNDLFQTTRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT, SEC ID n.º 41), que ha sido modificado para un direccionamiento periplásmico mejorado de las proteínas por la ruta Tat en comparación con el péptido de señal TorA de tipo salvaje. El péptido de señal Tor AF11 presenta o comprende la secuencia TTRRRFLA, SEC ID n.º 42, en la que los residuos subrayados son los residuos que difieren de la secuencia de señal de TorA de tipo salvaje, y los péptidos de señal que comprenden esta secuencia resultan particularmente preferentes siempre que se conserve el direccionamiento a la ruta Tat.

De esta manera, un péptido de señal preferente para la utilización en la presente invención es el péptido de señal Tor AH2 (MNNNDSFQTSRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT, SEC ID n.º 43), que ha sido modificado para un direccionamiento periplásmico mejorado de las proteínas por la ruta Tat en comparación con el péptido de señal TorA de tipo salvaje. El péptido de señal Tor AH2 presenta o comprende la secuencia SFQTSRRRFLA, SEC ID n.º 44, en la que los residuos subrayados son los residuos que difieren de la secuencia de señal de TorA de tipo salvaje, y los péptidos de señal que comprenden esta secuencia resultan particularmente preferentes siempre que se conserve el direccionamiento a la ruta Tat.

Además, pueden utilizarse derivados o variantes adicionales de los péptidos de señal anteriormente indicados, en particular puede utilizarse el péptido de señal Tor AB7, en los vectores de la invención siempre que dichas secuencias de derivado o variante muestran una capacidad conservada o mejorada de dirigir las proteínas a la ruta Tat. La capacidad de dirigir proteínas a la ruta Tat puede verificarse fácilmente utilizando cualquier técnica conveniente, por ejemplo utilizando las cepas mutantes *E. coli tatC* y *tatAE*, o por ejemplo utilizando el ensayo de informador proteico descrito en DeLisa et al., *supra*.

Las variantes apropiadas podrían comprender péptidos de señal que comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos, o una secuencia de nucleótidos codificante de una secuencia de aminoácidos, con una identidad de secuencia de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a las secuencias de péptido de señal anteriormente mencionadas, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias variantes deberían conservar o presentar la propiedad funcional de actuar como un péptido de señal que puede dirigir las proteínas a la ruta secretoria Tat. También podrían utilizarse truncados o fragmentos funcionales de dichas secuencias (o estas secuencias homólogas) siempre que se conserve la capacidad de codificar una proteína que conserve o presente la propiedad funcional de actuar como un péptido de señal. Otros ejemplos preferentes de péptidos de señal mutados son secuencias que contienen hasta 6, p. ej., hasta 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácido alterado en los péptidos de señal anteriormente indicados.

En realizaciones descritas de manera general en otros sitios en la presente memoria, en donde los vectores de la invención pueden codificar una segunda proteína de fusión de cubierta fágica no pVIII, p. ej., una segunda proteína (diferente) de cubierta fágica fusionada a una proteína de interés (PDI), en algunas de estas realizaciones puede utilizarse otro tipo de secuencia de señal (es decir, no Tat) con (puede ligarse operablemente) la fusión de proteína de cubierta fágica no pVIII o no utilizarse ninguna secuencia de señal, p. ej., con una fusión PDI-pIX no es necesario utilizar una secuencia de señal y en ocasiones preferentemente no se utiliza. En realizaciones en las que no se utiliza ninguna secuencia de señal, p. ej., con un constructo de fusión PDI-pIX, dichas proteínas de fusión de pIX generalmente se dirigirán a la ruta YidC. En realizaciones en las que se utiliza una secuencia de señal no Tat, la fusión de proteína de cubierta fágica no pVIII se dirigirá a una ruta secretaria no Tat, según determine la naturaleza de la secuencia de señal seleccionada, p. ej., a la ruta secretoria Sec.

En los vectores de la invención, la secuencia codificante del péptido de señal (el péptido de señal Tat) está ligado, p. ej., operablemente ligado, a la secuencia codificante de la proteína de fusión fluoróforo-pVIII, de manera que dirige la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII a la ruta secretoria Tat.

La expresión "proteína de fusión", "fusionado", etc., se utiliza en la presente memoria para describir la unión funcional de dos o más componentes proteicos en la misma secuencia polipeptídica o en el mismo marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés). Tales proteínas de fusión también pueden describirse como fusiones genéticas, ya que están codificadas por la misma secuencia de ácidos nucleicos (en ocasiones denominada "gen de fusión" o "secuencia nucleotídica de fusión"). Aunque dos (o más) componente proteicos (o secuencias de ácidos nucleicos codificantes) pueden ser directamente contiguos entre sí en dicha proteína de fusión, igualmente los componentes pueden unirse mediante espaciadores o conectores peptídicos apropiados. Tal como es bien conocido de la técnica, los espaciadores o conectores pueden ser importantes para permitir que cada uno de los componentes proteicos individuales se exprese de una manera funcional, p. ej., al permitirles formar la estructura tridimensional correcta para realizar o mantener su función nativa.

De esta manera, en las proteínas de fusión codificadas por los vectores de la invención, generalmente se incluye un espaciador (o conector) peptídico entre el fluoróforo y la parte pVIII de la proteína de fusión (en ocasiones denominada "proteína de fusión pVIII") o entre la proteína de interés (PDI) y la segunda proteína de cubierta fágica. En otras realizaciones, no es necesario incluir dichos conectores o espaciadores, o pueden incluirse solo entre algunos de los componentes. De esta manera, en los vectores de la presente invención, las secuencias codificantes del fluoróforo o la PDI pueden fusionarse con las secuencias codificantes de pVIII u otra proteína fágica, respectivamente, con o sin una secuencia de espaciador o conector entre los componentes. Todas estas posibilidades (es decir, proteínas de fusión o ácidos nucleicos codificantes con o sin secuencias de espaciador o conector) todavía se consideran fusiones directas o fusiones genéticas directas.

Aunque la presente discusión se centra en un conector o espaciador entre las proteínas e cubierta fágica y el fluoróforo o PDI, pueden incluirse secuencias de conector en otros sitios en los vectores de la invención, según resulte apropiado, p. ej., entre otros componentes de los vectores comentados en la presente memoria, por ejemplo entre el péptido de señal y el fluoróforo.

De esta manera, la expresión "proteína de fusión pVIII" se refiere a una proteína pVIII (proteína fágica pVIII), o fragmento de la misma, fusionada con un péptido o proteína exógeno, en este caso un fluoróforo. Las expresiones "proteína de fusión pIII", "proteína de fusión pIV", "proteína de fusión pVII" o "proteína de fusión pIX" se refieren a una proteína pIII, pVI, pVII o pIX (proteína fágica pIII, pVI, pVII o pIX) (según resulte apropiado), o fragmentos de la misma, fusionada con un péptido exógeno, p. ej., una proteína de interés (PDI).

De esta manera, los vectores de la invención comprenden una secuencia (una secuencia de ácidos nucleicos) codificante de un fluoróforo fusionado (genéticamente fusionado) con una secuencia codificante de una proteína de cubierta fágica pVIII (en ocasiones denominadas en la presente memoria "fluoróforo-pVIII"). El fluoróforo y la pVIII pueden encontrarse en cualquier orden o espaciado apropiado en el vector, siempre que, una vez procesados y empaquetados en partículas fágicas, se forme una proteína de fusión funcional entre el fluoróforo y la pVIII, en donde el componente pVIII de la proteína de fusión forma parte de la cubierta fágica y el fluoróforo se expresa o expone funcionalmente sobre la superficie de la partícula fágica. La parte fluoróforo de la proteína de fusión se posiciona de esta manera en el mismo marco que la parte pVIII de la proteína de fusión. Ello implica que el fluoróforo y la pVIII se expresan en la misma secuencia polipeptídica o, en otras palabras, en forma de una fusión directa. En los vectores de la invención resulta generalmente preferente que el componente fluoróforo de la proteína de fusión se posicione N-terminalmente (en el extremo N-terminal o en proximidad al mismo) respecto al componente pVIII de la proteína de fusión.

Debido a que el fluoróforo está fusionado con la proteína de cubierta fágica principal, pVIII, utilizando un enfoque de expresión por complementación clásico (tipo salvaje 8+8 (fagémido) o tipo salvaje 88 (genómico)), la partícula fágica final producida mediante la utilización de los vectores de la invención presentará múltiples copias del fluoróforo distribuidas aleatoriamente a lo largo de la longitud de la partícula fágica, junto con copias de la proteína pVIII de tipo salvaje. Debido a que, por ejemplo, los fagos M13 presentan aproximadamente 2700 copias de la proteína de cubierta principal pVIII en su superficie, puede encontrarse presentes muchas copias del fluoróforo. De esta manera, dicha expresión funcional del fluoróforo puede evaluarse convenientemente mediante monitorización de la fluorescencia, p. ej., fluorescencia detectable, mediante cualquier ensayo apropiado y conveniente. Tal como se muestra en los Ejemplos, dicha monitorización de la fluorescencia puede llevarse a cabo convenientemente mediante monitorización de la fluorescencia en células huésped transformadas, tales como *E. coli*, p. ej., utilizando microscopía de fluorescencia, o mediante análisis de muestras de partículas fágicas, p. ej., muestras líquidas, para la fluorescencia utilizando un lector de placas u otro aparato conveniente. También puede utilizarse el análisis de FACS o FLISA.

Debido a que presenta una fusión genética entre el fluoróforo y la proteína de cubierta fágica pVIII es importante para la presente invención, los fluoróforos convenientemente apropiados eran fluoróforos biológicos u otros fluoróforos que pueden estar codificados en una secuencia de ácidos nucleicos e incluirse de esta manera en los vectores de la invención. Preferentemente, dicho fluoróforo también será intrínsecamente fluorescente o directamente detectable. También pueden utilizarse fluoróforos que puedan activarse o que sean blanqueables.

Los fluoróforos preferentes para la utilización en la presente invención son fluoróforos biológicos que presentan o que comprenden una estructura o arquitectura de barril β .

Dichos fluoróforos serían bien conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, la revisión de Shaner et al., 2007, J. Cell Sci., 120(24):4247-4260) y entre ellos se incluyen la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) o derivados de la misma con la misma topología de plegado que GFP (también denominados "derivados de GFP"). En otras palabras, entre dichos fluoróforos para la utilización en la invención se incluyen la proteína fluorescente verde (GFP) o derivados fluoróforos de la misma que presentan una arquitectura o estructura de barril β o una arquitectura de GFP. Dichos fluoróforos no GFP puede denominarse convenientemente fluoróforos de tipo GFP o derivados de GFP o fluoróforos con arquitectura de GFP. Aunque actualmente se han aislado proteínas fluorescentes verdes de múltiples organismos, el término GFP tradicionalmente y en la presente memoria se refiere a la proteína aislada por primera vez a partir de la medusa *Aequorea victoria*. Esta proteína de tipo salvaje se ha sometido, sin embargo, a diversas modificaciones para producir la amplia diversidad de derivados de GFP o fluoróforos de tipo GFP actualmente descritos en la literatura.

Dichos fluoróforos contienen uno o más barriles β en forma de una unidad, por ejemplo pueden contener un único barril β (un monómero barril β) o múltiples barriles β , por ejemplo homotetrámeros de barril β .

La totalidad de dichos fluoróforos presentan o comprenden una estructura cilíndrica 3D similar en la que una gran parte del esqueleto polipeptídico está enrollada en una estructura de barril β que generalmente comprende 11 cadenas de láminas beta que circundan una hélice alfa central que contiene el cromóforo. La estructura de barril β forma un cilindro prácticamente perfecto, creando lo que puede denominarse estructura de "lata β " que caracteriza la familia de fluoróforos similares a GFP (derivados de GFP). De esta manera, en una perspectiva alternativa, los fluoróforos que contiene esta estructura de "lata β " también resultan preferentes para la utilización en la presente invención. Este cilindro de barril β presenta generalmente una anchura de aproximadamente 24 a 30 Å y una longitud de 40 a 42 Å.

La familia GFP de fluoróforos (GFP más variantes o derivados de GFP, o fluoróforos similares a GFP) incluye las variantes azul (BFP), cian (CFP) y amarilla (YFP), según el perfil de emisión espectral, así como variantes verdes de la GFP original. Son ejemplos adicionales la GFP potenciada (EGFP, por sus siglas en inglés), la CFP potenciada (ECFP) y la YFP potenciada (EYFP).

Aunque la familia GFP de fluoróforos (GFP más variantes o derivados de GFP, o fluoróforos similares a GFP o fluoróforos relacionados con la GFP) presentan algunas propiedades inherentemente diferentes, p. ej., el color de emisión, la intensidad de la fluorescencia y otras propiedades, tales como la estabilidad (y, en efecto, puede

manipularse de manera que presente dicha propiedades diferentes), la presencia y conservación de la estructura o arquitectura de barril β anteriormente descrita significa que generalmente se comportan de una manera similar. De esta manera, los miembros de la familia GFP de fluoróforos (o variantes de los mismos, p. ej., variantes funcionales con una identidad de secuencias de por lo menos 70 % u otros valores tal como se indica en otros sitios de la presente memoria) son fluoróforos preferentes para la utilización en la presente invención.

Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de dichos fluoróforos (y sus secuencias de aminoácidos) son bien conocidas y están descritas en la técnica, y pueden obtenerse fácilmente de bases de datos de la literatura o estándares (ver, por ejemplo, la entrada de pfam PF01353 o la entrada de Interpro IPR011584).

Algunos ejemplos específicos de fluoróforos apropiados, o fluoróforos similares a GFP (o fluoróforos variantes de GFP) o fluoróforos que contienen barril β , para la utilización en la presente invención son mNeonGreen (otra proteína fluorescente verde con fluorescencia amarilla-verde extremadamente brillante, Shaner et al., 2013, Nature Methods, 1(5):407-409), mGFPmut2 (una versión optimizada para FACS de GFP, Cormack et al., 1996, Gene 173:33-38) y mCherry (una proteína fluorescente roja, Shaner et al., 2004, Nat. Biotechnol., 22, 1567-1572), en donde "m" se refiere a "monomérico". Otros ejemplos podrían ser EGFP (o ECFP o EYFP). Los fluoróforos preferentes para la utilización en la presente invención son mNeonGreen, o un derivado o variante del mismo, y GFP o un derivado o variante del mismo, por ejemplo mGFPmut2 o algún otro derivado o variante, p. ej., EGFP (Heim et al., 1995, Nature 373:663-664). Un fluoróforo más preferente para la utilización en la presente invención es mNeonGreen o un derivado o variante del mismo.

mNeonGreen (Shaner et al., 2013, *supra*) es una proteína fluorescente verde monomérica brillante derivada de *Branchiostoma lanceolatum*. La proteína nativa original de *Branchiostoma lanceolatum* es un tetrámero y esto ha sido modificado (tal como se describe en Shaner et al., 2013, *supra*) para obtener NeonGreen monomérica (m) (es decir, mNG), que se utiliza en la presente invención. El mutante final contiene 21 sustituciones respecto a la proteína inicial tetramérica y presenta picos agudos de excitación y emisión (en 506 nm y 517 nm). De esta manera, mNeonGreen puede utilizarse para obtener imágenes con una pérdida esencialmente nula de fotones de emisión utilizando conjuntos de filtros de paso de banda o de paso largo estándar para proteínas fluorescentes verdes. La secuencia del constructo sintético para mNeonGreen presenta el código de acceso GenBank KC295282.1 y se repite posteriormente por completitud. La secuencia de ácidos nucleicos presenta 711 pares de bases de longitud (SEC ID n.º 45):

```

1 atggtgagca agggcgagga ggataacatg gcctctctcc cagcgacaca tgagttacac
61 atctttggct ccatcaacgg tgtggacttt gacatggttg gtcagggcac cggcaatcca
121 aatgatggtt atgaggagtt aaacctgaag tccaccaagg gtgacctcca gttctccccc
181 tggattctgg tccctcatat cgggtatggc ttccatcagt acctgcccta cctgacggg
241 atgtcgctt tccagggcgc catggttagat ggctccggat accaagtcca tcgcacaatg
301 cagtttgaag atggtgcctc ctttactggt aactaccgct acacctacga gggaagccac
361 atcaaaggag agggccaggt gaaggggact ggtttccctg ctgacgggtc tgtgatgacc
421 aactcgctga ccgctgcgga ctggtgcagg tcgaagaaga cttaccccaa cgacaaaacc
481 atcatcagta cctttaagtg gagttacacc actggaaatg gcaagcgcta cggagcact
541 gcgcggacca cctacacctt tgccaagcca atggcggcta actatctgaa gaaccagccg
601 atgtacgtgt tccgtaagac ggagctcaag cactccaaga ccgagctcaa cttcaaggag
661 tggcaaaagg cctttaccga tgtgatgggc atggacgagc tgtacaagta a

```

El identificador de proteína para la proteína codificada es AGG56535.1, que presenta la secuencia indicada posteriormente (236 aminoácidos, SEC ID n.º 46):

```

1 mvskgeednm aslpathelh ifgsingvdf dmvgggtgnp ndgyeelnlk stkgdlqfsp
61 wilvphigy fhqylpypdg mspfqaaamd gsgyqvhrtm qfedgasltv nyrytyegsh
121 ikgeaqvkgf gfpadgpvmt nsltaadwcr skktypndkt iistfkwsyt tgnrkryrst
181 arttytfakp maanylknqp myvfrktelk hsktelnfke wqkaftdvmg mdelyk

```

En realizaciones de la invención en las que el vector codifica el fluoróforo mNeonGreen, la secuencia de ácidos nucleicos indicada anteriormente puede incorporarse en los vectores de la invención. Debido a que en los vectores de la invención, la secuencia codificante de mNeonGreen está codificada en forma de una proteína de fusión cadena abajo de un péptido de señal, en la secuencia de nucleótidos de mNeonGreen incorporada en los vectores de la invención convenientemente se han eliminado los codones iniciales de inicio (atg) y parada (taa).

En realizaciones preferentes de la invención, se utiliza una versión de codones optimizados de dicha secuencia de ácidos nucleicos que ha sido optimizada para la expresión bacteriana, p. ej., en *E. coli*. Aunque puede utilizarse cualquier versión de codones optimizados apropiada, a continuación se describe de manera general una secuencia específica para una versión optimizada para los codones de mNeonGreen que puede utilizarse en la presente

invención. (Nuevamente, los codones de inicio y parada han sido omitidos para una mejor incorporación en los vectores).

```

GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACGAACTGCACATCTTCGGTTCTA
TCAACGGTGTGACTTCGACATGGTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAAGTGA
CCTGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCCGCACATCGGTTACGGTTTC
CAACAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGGTTGACGGTTCTGGTTACC
AGGTTACCGGTACCATGCAGTTCAAGACGGTGCTTCTCTGACCGTTAACTACCGTTACACCTACGAAGG
TTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAGGTACCGGTTTCCCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAAC
TCTCTGACCGCTGCTGACTGGTGCCGTTCTAAAAAACCTACCCGACGACAAAACCATCATCTCTACCT
TCAAATGGTCTTACACCACCGGTAACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGC
TAAACCGATGGCTGCTAACTACCTGAAAAACCGCGATGTACGTTTCCGTAAACCCGAAGTGAACAC
TCTAAACCCGAAGTGAAGTTCRAAGAATGGCAGAAAGTTTACCCGACGTTATGGGTATGGACGAAGTGT
ACAAA (SEC ID n.º 3)

```

La totalidad de estas versiones de codones optimizados codifica la misma secuencia de aminoácidos que AGG56535.1, anteriormente. Sin embargo, debido a que la secuencia de nucleótidos codificante del residuo de metionina inicial ha sido omitida, la secuencia de aminoácidos codificada es:

```

VSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNP NDGYEELNLK
STKGLQFSP WYLVPHIGYG FRQYLFYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRTM
QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKG TGFADGPVMT NSLTAADWOR
SKKTYPNDKT IISTEKWSTY TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP
MYVFRKTELK HSRTELNFKE WQKAFIDVMG MDLYR (SEC ID n.º 4) .

```

Tal como se ha indicado anteriormente y como se discute en mayor detalle en otros sitios en la presente memoria, en otras realizaciones de la invención el vector comprende una secuencia codificante de un derivado o variante del fluoróforo mNeonGreen (mNG), p. ej., un derivado o variante de SEC ID n.º 4 o n.º 46, o un derivado o variante de SEC ID n.º 45 o n.º 3.

De esta manera, en otras realizaciones, el fluoróforo mNG codificado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a la SEC ID n.º 4, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de mNG variantes deben conservar o presentar la propiedad funcional de actuar como un fluoróforo. También podrían utilizarse truncados o fragmentos funcionales de la SEC ID n.º 4 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de mNG, siempre que se conserve la capacidad de codificar una proteína que conserve o presente la propiedad funcional de actuar como un fluoróforo.

Igualmente, la molécula de ácidos nucleicos codificante del fluoróforo mNG puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % u 80 % respecto a la SEC ID n.º 45 o n.º 3, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de nucleótidos de mNG variantes deben codificar una proteína que conserve o presente la propiedad funcional de actuar como un fluoróforo. Los truncados o fragmentos funcionales de SEC ID n.º 45 o n.º 3 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de mNG, también podrían utilizarse, siempre que se conserve la capacidad de codificar una proteína que conserve o presente la propiedad funcional de actuar como un fluoróforo.

La expresión "proteína de cubierta fágica pVIII" o "proteína pVIII" o "proteína fágica pVIII" o "proteína de cubierta pVIII", etc., tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una proteína pVIII que se origina o deriva de un fago filamentoso (secuencia de tipo salvaje o nativa) o una proteína pVIII con una secuencia que corresponda a la secuencia de dicha proteína pVIII. Son fagos filamentosos preferentes a partir de los que se deriva la proteína pVIII o de los que corresponde la proteína VIII, los fagos M13, fd y f1. Puede utilizarse cualquier proteína pVIII apropiada, siempre que presente la capacidad de exponer un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII. Preferentemente, la proteína pVIII codificada por los vectores de la invención corresponde a la proteína pVIII madura (de longitud completa), es decir, carece del péptido de señal de pVIII. Preferentemente, las proteínas pVIII codificadas por los vectores de la invención comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos siguiente, que corresponde a la proteína pVIII madura de tipo salvaje (de longitud completa) del fago filamentoso M13 sin su secuencia de señal.

AEGDDPAKAAFNSLQASATEYIGYAWAMVVVIVGATIGIKLFKKFTSKAS

(SEC ID n.º 8)

Una secuencia de ácidos nucleicos de ejemplo codificante de dicha secuencia para la inclusión en los vectores se proporciona en otro sitio en la presente memoria como SEC ID n.º 7.

En otras realizaciones, la proteína pVIII codificada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a la de SEC ID n.º 8, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Tal como se ha indicado anteriormente, estas secuencias de pVIII variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de exponer un fluoróforo como una proteína de fusión de pVIII. Los truncados o fragmentos funcionales de SEC ID n.º 8 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de pVIII, también podrían utilizarse, siempre que conserven la capacidad de exponer un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII.

Igualmente, la molécula de ácidos nucleicos codificante de la proteína pVIII comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a la de SEC ID n.º 7, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de nucleótidos de pVIII variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de codificar un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII que pueda exponerse sobre una partícula fágica. Los truncados o fragmentos funcionales de SEC ID n.º 7 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de pVIII, también podrían utilizarse siempre que se conserve la capacidad de codificar un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII que pueda exponerse sobre una partícula fágica.

Las variantes de pVIII preferentes presentan una mutación de valina a isoleucina en, o correspondiente a, la posición 33 de la SEC ID n.º 8 (es decir, presentan un residuo isoleucina en, o correspondiente a, la posición 33 de la SEC ID n.º 8) o presentan un codón de isoleucina ATA en, o correspondiente a, los residuos 97 a 99 de la SEC ID n.º 7, tal como se describe en otros sitios en la presente memoria. Una variante particularmente preferente de pVIII es la secuencia de pVIII que se encuentra en el clon F03 tal como se describe en otros sitios de la presente memoria. Los fragmentos o truncados de pVIII preferentes son fragmentos o truncados funcionales que incluyen el residuo correspondiente a la posición 33 de la SEC ID n.º 8 al nivel de aminoácidos o de nucleótidos.

Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, en algunas realizaciones, los vectores del a invención codifican otras proteínas de cubierta fágica no pVIII, tales como las proteínas de cubierta pIII, pVI, pVII o pIX.

La expresión "proteína de cubierta fágica pIII" o "proteína pIII" o "proteína fágica pIII" o "proteína de cubierta pIII", etc., tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una proteína pIII originada o derivada de un fago filamentoso (secuenciada de tipo salvaje o nativa), o una proteína pIII con una secuencia que corresponde a la secuencia de dicha proteína pIII. Los fagos filamentosos preferentes a partir de los cuales se deriva la proteína pIII o a los que corresponde la proteína pIII son los fagos M13, fd y f1. Puede utilizarse cualquier proteína pIII apropiada, siempre que posea la capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pIII. Preferentemente, la proteína pIII codificada por los vectores de la invención corresponde a la proteína pIII madura, es decir, carece del péptido de señal de pIII. Preferentemente, las proteínas pIII codificadas por los vectores de la invención comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos siguiente, que corresponde a la proteína pIII madura de tipo salvaje del fago filamentoso M13 sin su secuencia de señal (ver también (Genbank AY598820.1)).

```
>pIII_1
AETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNATGVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGG
GSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPFGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNR
FRNRQGALFVYTGTVTQGTDFVKTYTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQGSSDL
PQPPVNAGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYKEMANANKGAMTENADENAL
QSDAKGKLDSVATDYGAADGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDNSPLMNNFRQYLPSLPQ
SVECRPFVFGAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILRNKES
```

(SEC ID n.º 12)

Una secuencia de ácidos nucleicos de ejemplo codificante de dicha secuencia de aminoácidos para la inclusión en los vectores se proporciona a continuación, como SEC ID n.º 11.

```
GCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACG
ACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAAGTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTGTAC
TGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCTCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGT
GGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGGT
```

ATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAA
 CCCCCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCATGTTTCAGAATAATAGG
 TTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCACCTGTTACTCAAGGCACCTGACCCCGTTAAAA
 CTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGA
 CTGCGCTTTTCCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTG
 CCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGGCGCTCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCT
 CTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGA
 TTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTA
 CAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTGCTATCGATGGTTTCATTG
 GTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGTCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGC
 TCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTCCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAA
 TCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAA
 TAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTCTACGTT
 TGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAA

(SEC ID n.º 11)

- 5 En otras realizaciones, la proteína pIII codificada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a la de SEC ID n.º 12, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de nucleótidos de pIII variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pIII. Los truncados o fragmentos
- 10 funcionales de SEC ID n.º 12 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de pIII, también podrían utilizarse siempre que se conserve la capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pIII. Los ejemplos de proteínas pIII truncadas apropiadas para la exposición, p. ej., truncados que contienen únicamente la porción C-terminal de pIII son bien conocidos y se describen en la técnica.
- 15 La expresión "proteína de cubierta fágica pVI" o "proteína pVI" o "proteína fágica pVI" o "proteína de cubierta pVI", etc., tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una proteína pVI originada o derivada de un fago filamentoso (secuencias de tipo salvaje o nativas), o una proteína pVI con una secuencia que corresponde a la secuencia de dicha proteína pVI. Los fagos filamentosos preferentes a partir de los que se deriva la proteína pVI o a la que corresponden la proteína VI son los fagos M13, fd y f1. Puede utilizarse cualquier proteína pVI apropiada siempre que posea la
- 20 capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pVI. Preferentemente, las proteínas pVI codificadas por los vectores de la invención comprenden o consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente, que corresponde a la proteína pVI del fago ayudante VCSM13 (Genbank AY598820.1).

MPVLLGIPLLLRFLGLLVTLFGYLLTFLKKGFGKIAIAISLFLALIIGLNSILVGYLSDISAQ
 LPSEDFVQGVQLILPSNALPCFYVILSVKAAIFIDVKQKIVSYLDWDK

(SEC ID n.º 13)

- 25 En otras realizaciones, la proteína pVI codificada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a la de SEC ID n.º 13, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de pVI variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pVI. Los truncados o fragmentos funcionales de SEC ID
- 30 n.º 13 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de pVI, también podrían utilizarse siempre que se conserve la capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pVI.
- 35 La expresión "proteína de cubierta fágica pVII" o "proteína pVII" o "proteína fágica pVII" o "proteína de cubierta pVII", etc., tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una proteína pVII originada o derivada de un fago filamentoso (secuencias de tipo salvaje o nativas), o una proteína pVII con una secuencia que corresponde a la secuencia de dicha proteína pVII. Los fagos filamentosos preferentes a partir de los que se deriva la proteína pVII o a la que corresponden la proteína VII son los fagos M13, fd y f1. Puede utilizarse cualquier proteína pVII apropiada siempre que posea la capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pVII. Preferentemente,
- 40 las proteínas pVII codificadas por los vectores de la invención comprenden o consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente, que corresponde a la proteína pVII de tipo salvaje del fago ayudante VCSM13 (Genbank AY598820.1).

MEQVADFDTIYQAMIQISVVLFCFALGIIAGGQR

(SEC ID n.º 14)

- 45 En otras realizaciones, la proteína pVII codificada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a la de SEC ID n.º 14, tal como una identidad

de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de pVII variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pVII. Los truncados o fragmentos funcionales de SEC ID n.º 14 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de pVII, también podrían utilizarse siempre que se conserve la capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pVII.

La expresión "proteína de cubierta fágica pIX" o "proteína pIX" o "proteína fágica pIX" o "proteína de cubierta pIX", etc., tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una proteína pIX originada o derivada de un fago filamentosos (secuencias de tipo salvaje o nativas), o una proteína pIX con una secuencia que corresponde a la secuencia de dicha proteína pIX. Los fagos filamentosos preferentes a partir de los que se deriva la proteína pVII o a la que corresponden la proteína IX son los fagos M13, fd y f1. Puede utilizarse cualquier proteína pIX apropiada siempre que posea la capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pIX. Preferentemente, las proteínas pIX codificadas por los vectores de la invención comprenden o consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente, que corresponde a la proteína pIX de tipo salvaje del fago ayudante VCSM13 (Genbank AY598820.1).

MSVLVYSFASFVLGWCLRSGITYFTRLMETSS

(SEC ID n.º 15)

En otras realizaciones, la proteína pIX codificada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, 75 % o 80 % respecto a la de SEC ID n.º 15, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de pIX variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pIX. Los truncados o fragmentos funcionales de SEC ID n.º 15 (o estas secuencias homólogas) u otras secuencias de pIX, también podrían utilizarse siempre que se conserve la capacidad de exponer una PDI en forma de una proteína de fusión de pIX.

En la presente invención, la "identidad de secuencias" es una medida de la identidad entre proteínas al nivel de aminoácidos y una medida de la identidad entre ácidos nucleicos al nivel de nucleótidos. La identidad de secuencias de proteína puede determinarse mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos en una posición dada en cada secuencia cuando las secuencias están alineadas. Análogamente, la identidad de secuencia de ácidos nucleicos puede determinarse mediante comparación de la secuencia de nucleótidos en una posición dada en cada secuencia cuando las secuencias están alineadas. En donde se hace referencia en la presente memoria a moléculas variante o derivadas, por ejemplo mediante valores de porcentaje de identidad, p. ej., por lo menos 70 %, etc., debe entenderse que dichas variantes o derivados son variantes o derivados generalmente funcionales, es decir, muestran una función conservada o mejorada.

Los métodos para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos son bien conocidos y están descritos en la técnica, y puede utilizarse cualquiera de ellos. Por ejemplo, para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, se alinean las secuencias con fines de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). A continuación, se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas / n° total de posiciones (p. ej., posiciones solapantes) x 100). En algunas realizaciones, las dos secuencias son de la misma longitud.

Pueden alinearse manualmente las secuencias y contar el número de aminoácidos idénticos. Alternativamente, puede llevarse a cabo la alineación de dos secuencias para la determinación del porcentaje de identidad utilizando un algoritmo matemático. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul et al., 1990). Pueden llevarse a cabo búsquedas de BLAST de nucleótidos con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12, con el fin de obtener secuencias de nucleótidos homólogas de moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Pueden llevarse a cabo búsquedas de BLAST de proteínas con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las de una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, puede utilizarse BLAST con huecos ("Gapped BLAST"). Alternativamente, puede utilizarse PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterativa que detecte relaciones distantes entre moléculas. Al utilizar los programas NBLAST, XBLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos. Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alternativamente, puede calcularse una identidad de secuencias después de alinear las secuencias, p. ej., con el programa BLAST en la base de datos EMBL (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). Generalmente, para la alineación pueden utilizarse los parámetros por defecto con respecto a, p. ej., la "matriz de puntuaciones" y la "penalización por hueco". En el contexto de la presente invención, la configuración por defecto de BLASTN y PSI BLAST puede resultar ventajosa. En el cálculo del porcentaje de identidad, solo se cuentan las correspondencias exactas.

En realizaciones preferentes de la invención, en los constructos de vector se incluyen uno o más sitios de unión a ribosoma (ribosómicos) (RBS, por sus siglas en inglés). Dichos componentes también pueden denominarse "región de inicio de traducción" (TIR, por sus siglas en inglés).

La secuencia RBS está situada en el vector en una posición apropiada para que la secuencia RBS funcione. La función de RBS es atraer un ribosoma durante el inicio de la traducción de la proteína y, de esta manera, está situado convenientemente a una distancia apropiada cadena arriba del codón de inicio de la proteína que se desea traducir, o cadena arriba del ORF para la proteína que se desea traducir. De esta manera, en los vectores de la presente invención, la secuencia RBS se sitúa convenientemente cadena arriba de la secuencia codificante del péptido de señal (en realizaciones en las que un péptido de señal es parte del ORF, p. ej., para la proteína de fusión fluoróforo-pVIII). En realizaciones en las que no hay péptido de señal en el ORF, p. ej., en algunas realizaciones en las que una PDI está fusionada a una segunda proteína de cubierta no pVIII, entonces la secuencia RBS se sitúa convenientemente a una distancia apropiada cadena arriba de la secuencia codificante de la PDI o de la proteína de cubierta. La distancia apropiada será fácilmente determinada por el experto en la materia según la secuencia RBS seleccionada. Las distancias de ejemplo pueden ser de siete u ocho nucleótidos desde el codón de inicio ATG, aunque ello puede variar.

La secuencia RBS/TIR modula la intensidad de la traducción (nivel de expresión de proteína) de las secuencias situadas cadena abajo y diferentes tipos de RBS pueden producir diferentes niveles de expresión de proteína, por ejemplo una expresión débil o fuerte. Las secuencias RBS/TIR débiles o fuertes son bien conocidas de la técnica y pueden ser fácilmente seleccionadas por el experto en la materia según el nivel de expresión de proteína deseado. Previsiblemente, una RBS fuerte facilita o induce más traducción (una traducción fuerte) frente a una RBS débil. Tal como se explicará en mayor detalle posteriormente, en realizaciones preferentes de la invención, se utiliza una RBS débil, en particular para controlar la traducción de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII.

En particular, en vectores preferentes de la invención, se incluye una RBS cadena arriba (o 5' o N-terminal respecto a) el codón de inicio de la secuencia codificante del péptido de señal que dirige proteínas a la ruta secretoria Tat. Una RBS preferente para la utilización en la presente invención es una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) o una secuencia basada en SD que puede incluirse en los constructos de vector. Las secuencias SD son bien conocidas y están descritas en la técnica y puede utilizarse cualquiera de ellas. Por ejemplo, la secuencia central SD es GAGG (SEC ID n.º 47) y otras secuencias de consenso son AGGAGG (SEC ID n.º 48) o AGGAGGU (SEC ID n.º 49). De esta manera, pueden utilizarse secuencias SD que comprenden dichas secuencias centrales o de consenso.

Las secuencias SD débiles o fuertes son bien conocidas de la técnica y pueden ser fácilmente seleccionadas por el experto en la materia con el fin de controlar el nivel o cantidad de expresión de proteína para cualquier ORF dado. Por ejemplo, una SD fuerte podrá unirse bien a un ribosoma. Dicha SD fuerte generalmente contendrá la secuencia central SD o una de las secuencias de consenso indicadas anteriormente de manera exacta, o con muy pocos cambios, y/o por ejemplo contendrá varios residuos de A y/o G próximos. Alternativamente, una SD fuerte puede obtenerse mediante la inserción de otros componentes junto con una secuencia central SD o de consenso (o una secuencia altamente relacionada). Dichos componentes adicionales son bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo puede utilizarse una secuencia SD clásica o de consenso junto con una secuencia épsilon (p. ej., TTAACCTTA, SEC ID n.º 50). Por ejemplo, en la presente invención, una SD fuerte preferente es la TIR T7g10 (Olins et al., 1988, Gene 73:227-235) que incluye, además, una secuencia épsilon (p. ej., TTAACCTTA, SEC ID n.º 50). De esta manera, en ejemplos específicos de los vectores de la invención en los que se utiliza una SD fuerte, la región cadena arriba del sitio de inicio ATG del péptido de señal Tat puede presentar la secuencia TTAACCTTAAGGAGATATACAT, SEC ID n.º 31 (secuencia épsilon subrayada y secuencia SD de consenso en negrita). Sin embargo, el experto en la materia podrá seleccionar fácilmente otras secuencias SD/TIR fuertes.

Previsiblemente, una SD fuerte facilita o induce más traducción (traducción fuerte o elevada) que una SD débil, que facilitará o inducirá una cantidad de traducción baja (o débil o menos eficiente).

Puede utilizarse una secuencia RBS o SD fuerte o débil en los constructos de vector de la invención. Uno de los objetivos de la invención es incrementar la fluorescencia de una partícula fágica mediante el incremento del número de proteínas de fusión de fluoróforo-pVIII incorporados en la cubierta (sobre la superficie) del fago. Esto generalmente favorecería la utilización de una secuencia SD fuerte para obtener más traducción. De esta manera, es algo inesperado que en algunas realizaciones una secuencia SD débil (o una RBS débil) produzca mejores resultados, p. ej., en términos de mejor exposición funcional de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII o una exposición incrementada (p. ej., más copias por partícula) de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, resultando preferentemente en una fluorescencia incrementada de las partículas fágicas.

De esta manera, en algunas realizaciones, resulta preferente la utilización de una secuencia SD débil (o una RBS débil) en el constructo de vector cadena arriba de la secuencia codificante del ORF que comprende el péptido de señal Tat y la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII. En otras palabras, la RBS (o SD) que controla o gobierna la traducción del péptido de señal Tat y, por lo tanto, de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII es una SD débil (o una RBS débil). Preferentemente, la utilización de dicha secuencia SD débil resulta en más copias de la proteína de fusión de

fluoróforo-pVIII intacta incorporada en la cubierta del fago en comparación con un constructo en el que se utilice una SD fuerte (o una RBS fuerte) o en el caso de que se utilice una secuencia SD de consenso, p. ej., AGGAGG (u otras secuencias de consenso tal como se han definido anteriormente).

En efecto, los constructos de vector en los que la eficiencia de traducción de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII es baja, débil, reducida o no óptima resultan generalmente preferentes. Por ejemplo, las modificaciones/moléculas variantes preferentes tal como se describe en otros sitios en la presente memoria son aquellos en los que la eficiencia o velocidad de traducción, por ejemplo y en particular de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, es reducida o significativamente reducida, por ejemplo en comparación con la secuencia parental original. Preferentemente, dicha eficiencia o velocidad de traducción reducida o débil (o disminuida) también resulta en más copias de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII sobre la superficie del fago y/o en un número incrementado de fluoróforos funcionales sobre la superficie del fago, y de esta manera, en una fluorescencia incrementada.

En realizaciones preferentes de la invención, aunque opcionales, puede incluirse una o más etiquetas, p. ej. etiquetas de proteína o péptido, en los constructos de vector. Dichas etiquetas puede utilizarse convenientemente para la detección y, de esta manera, en estas realizaciones, podría utilizarse cualquier etiqueta detectable. Las etiquetas también pueden utilizarse con otros fines, tales como el enriquecimiento en proteínas de fusión que contienen etiqueta, por ejemplo antes de que tenga lugar el cribado de la fluorescencia fágica, p. ej., mediante FACS. Las etiquetas de péptidos antígenos (o etiquetas epitopo), tales como las etiquetas FLAG, c-myc, HA (hemaglutinina), HIS, HAT o V5, resultan particularmente preferentes para la utilización en realizaciones de la invención al utilizar técnicas de FACS u otras técnicas de detección fluorescente, ya que estas etiquetas permiten fácilmente el marcaje mediante la utilización de anticuerpos contra la etiqueta específica marcados fluorescentemente fácilmente disponibles. Igualmente pueden utilizarse otras etiquetas de péptido antígeno conocidas de la técnica.

Una etiqueta FLAG es una etiqueta preferente para la utilización en los vectores de la presente invención. La etiqueta FLAG es una etiqueta octapéptido y comprende la secuencia DYKDDDDK (SEC ID n.º 10). También pueden utilizarse derivados de la etiqueta FLAG, los cuales son bien conocidos y de referencia en la técnica. Además, los anticuerpos que pueden reconocer las diversas etiquetas FLAG y que, de esta manera, pueden marcarse fluorescentemente y utilizarse para la detección de la etiqueta FLAG también están bien descritos en la técnica, p. ej., los anticuerpos M1 y M2.

Otras etiquetas para la utilización en la presente invención (como una alternativa o además de una etiqueta péptido antigénico, y en particular una etiqueta FLAG) son las etiquetas de biotina, que pueden capturarse, por ejemplo, mediante la unión a estreptavidina o avidina, o moléculas de tipo avidina, sobre una fase sólida, o pueden marcarse, p. ej., marcarse fluorescentemente, mediante la utilización de una forma marcada fluorescentemente de estreptavidina, avidina o moléculas de tipo avidina. Las etiquetas de biotina apropiadas para la utilización en los constructos de la presente invención son bien conocidas por el experto en la materia. Las etiquetas de biotina para la utilización en los métodos de la presente invención pueden comprender moléculas de biotina de por sí, p. ej., moléculas de biotina que se unen, p. ej., mediante conjugación química, a la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII expresada sobre la superficie fágica. Los métodos para unir dichas etiquetas de biotina son bien conocidos de la técnica.

Alternativamente, las etiquetas de biotina pueden comprender fracciones, p. ej., péptidos, que pueden actuar como sustratos para reacciones de biotilación y, de esta manera, unirse a moléculas de biotina. Dichas etiquetas peptídicas pueden incorporarse fácilmente en los vectores de la invención. Por ejemplo, una etiqueta de biotina de ejemplo para la utilización en la presente invención es AviTag™ (MSGLNDIFEAQKIEWHE, SEC ID n.º 52), que es una etiqueta disponible comercialmente de Avidity LLC, Aurora, Colorado, EE. UU., que se biotinila *in vitro* o *in vivo* mediante la biotín ligasa.

Otro ejemplo de una etiqueta de biotina preferente es Strep-tag, que también se encuentra disponible comercialmente de IBA GmbH, Göttingen, Alemania, y que es capaz de unirse al bolsillo de unión a biotina de la estreptavidina. Preferentemente, Strep-tag comprende la secuencia de 8 aminoácidos Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (WSHPQFEK, SEC ID n.º 53). Cualesquiera otras etiquetas de proteína o péptido que sean capaces de unirse a la estreptavidina o a la avidina podría utilizarse igualmente.

Podrían utilizarse combinaciones de una o más de las etiquetas anteriormente indicadas para marcar las partículas fágicas de manera que haya múltiples marcajes.

Las etiquetas preferentes son etiquetas proteicas o etiquetas peptídicas que pueden incorporarse fácilmente en los constructos de vector (p. ej., los constructos de exposición fágica) de la invención, p. ej., utilizando técnicas estándares de recombinación y clonación.

La secuencia de etiqueta puede estar situada en el vector en cualquier posición apropiada para que la etiqueta funcione, p. ej., para expresarse y ser detectable. Dichas etiquetas pueden ser, de esta manera, internas, o estar situadas en el lado N-terminal o C-terminal de la parte del constructo que se está etiquetando y que va a detectarse utilizando la etiqueta. En la presente invención, puede utilizarse convenientemente una etiqueta para detectar la expresión de la parte fluoróforo-pVIII del constructo. De esta manera, la etiqueta puede situarse convenientemente

dentro de la parte del constructo (ORF) codificante de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, por ejemplo dentro (interna) o en (o próxima a) el extremo N-terminal o en (o próxima) al extremo C-terminal de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII.

5 En los vectores de la presente invención, una posición preferente para la secuencia codificante de la etiqueta proteína se encuentra en o en proximidad al extremo N-terminal del fluoróforo en la fusión fluoróforo-pVIII. Por ejemplo, la secuencia codificante de la etiqueta proteína puede estar situada entre el péptido de señal y el fluoróforo.

10 En realizaciones preferentes de la invención, la etiqueta proteína es una etiqueta FLAG (o un derivado de la misma) u otra etiqueta con carga negativa. Sin respaldo teórico se cree que presentar una etiqueta con carga negativa, preferentemente situada en o próxima al extremo N-terminal del fluoróforo, por ejemplo entre el péptido de señal y el fluoróforo, puede resultar en una estabilidad mejorada y, por lo tanto, un mejor plegamiento de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, que es un fenómeno observado con otras estructuras β (Schaefer, 2012, J. Mol. Biol., 417:309-335 y Dudgeon et al., 2012, PNAS, 109:10879-10884).

15 Una estructura de ejemplo para un constructo de la invención con una proteína de fusión de fluoróforo-pVIII se muestra en la figura 1. Tal como se describe en otros sitios de la presente memoria, la etiqueta FLAG tal como se muestra en la figura 1 (u otra etiqueta) resulta preferente, aunque es opcional.

20 En vectores preferentes de la invención, se incluye una secuencia codificante de un espaciador o conector entre la secuencia codificante del fluoróforo y la secuencia codificante de la proteína de cubierta fágica pVIII. La secuencia puede ayudar al plegamiento de las proteínas conectadas, en particular la proteína N-terminal (en la presente invención generalmente el fluoróforo) y la longitud del espaciador o conector puede ajustarse según sea apropiado para permitir el mejor plegamiento funcional o uno satisfactorio, de ambos componentes. Las longitudes apropiadas
25 podrán ser fácilmente determinadas por el experto en la materia. Sin embargo, las longitudes de ejemplo serían de entre cinco y 15 aminoácidos (Weiss et al., 2000, Protein Sci., 9:647-654), p. ej., de 6 a 10 aminoácidos. Un conector particular utilizado en la presente invención presenta una longitud de 8 aminoácidos. La secuencia del conector habitualmente es menor relevante que la longitud. Sin embargo, el conector utilizado en los vectores de ejemplos presenta la secuencia GGGSGGGS (SEC ID n.º 6, codificada en, por ejemplo, la SEC ID n.º 5). De esta manera, este
30 conector resulta preferente para algunas realizaciones de la invención, aunque se apreciará que también pueden utilizarse conectores (espaciadores) con otras secuencias y longitudes.

Los vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) preferentes de la invención codifican la secuencia que comprende SEC ID n.º A o 16 (que comprende mNeonGreen, un conector y los 30 aminoácidos N-terminales de pVIII) o una
35 secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 70 % respecto a ella (otros valores de ejemplo de porcentaje de identidad se describen en otros sitios en la presente memoria).

Otros vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) preferentes de la invención codifican la secuencia que comprende la SEC ID n.º C o 18 (que comprende mNeonGreen, un conector y pVIII de longitud completa) o una secuencia con
40 una identidad de secuencia de por lo menos 70 % respecto a ella (otros valores de ejemplo de porcentaje de identidad se describen en otros sitios en la presente memoria).

Otros vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) preferentes de la invención codifican la secuencia que comprende la SEC ID n.º E o 20 (que comprende Tor AB7, mNeonGreen, un conector y pVIII de longitud completa) o una secuencia
45 con una identidad de secuencia de por lo menos 70 % respecto a ella (otros valores de ejemplo de porcentaje de identidad se describen en otros sitios en la presente memoria).

Otros vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) preferentes de la invención codifican la secuencia que comprende la SEC ID n.º G o 22 (que comprende Tor AB7, etiqueta FLAG, mNeonGreen, un conector y pVIII de longitud completa) o una secuencia
50 con una identidad de secuencia de por lo menos 70 % respecto a ella (otros valores de ejemplo de porcentaje de identidad se describen en otros sitios en la presente memoria).

También se proporcionan vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) codificantes de secuencias que comprende SEC ID n.º K o 26 (que comprende Tor AB7, mNG, un conector y los 30 aminoácidos N-terminales de pVIII) o SEC ID n.º
55 M o 28 (que comprende Tor AB7, etiqueta FLAG, mNG, un conector y los 30 aminoácidos N-terminales de pVIII) o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a ella (otros valores de ejemplo de porcentaje de identidad se describen en otros sitios en la presente memoria).

Cualquiera de dichas secuencias de vector (p. ej., secuencias codificantes de SEC ID n.º A o 16, C o 18, E o 20, G o
60 22, K o 26, o M o 28, o variantes de las mismas) son ejemplos de secuencias que pueden utilizarse en un vector parental y someterse a variación o modificación adicional tal como se indica de manera general posteriormente.

Una secuencia de vector de ejemplo adicional para la utilización en la invención se muestra en la figura 9 (SEC ID n.º
65 54 y n.º 55).

Las variantes de pVIII preferentes, por ejemplo en las SEC ID n.º C o 18, E o 20, G o 22, 54 o 55, presentan una mutación de valina a isoleucina en, o correspondiente a, la posición 33 de SEC ID n.º 8 (es decir, presentan un residuo de isoleucina en, o correspondiente a, la posición 33 de la SEC ID n.º 8) o presentan un codón de isoleucina ATA en, o correspondiente a, los residuos 97 a 99 de la SEC ID n.º 7, tal como se describe en otros sitios de la presente memoria. Una variante de pVIII particularmente preferente es la secuencia de pVIII tal como se encuentran en el clon F03 tal como se describe en otros sitios en la presente memoria.

Los vectores de exposición fágica de la invención tal como se ha indicado anteriormente también pueden utilizarse para producir vectores modificados o variantes adicionales que pueden utilizarse para producir partículas fágicas fluorescentes. Dichos vectores modificados (o variantes, derivados o mutantes) también forman parte de la invención. Dichas modificaciones (o mutaciones) implican, por ejemplo, la adición, delección, sustitución o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de un vector parental para formar un nuevo vector, en donde dicho vector parental es uno de los vectores de la invención tal como se ha definido anteriormente, y el ensayo del nuevo vector resultante para identificar vectores que pueden utilizarse para producir partículas fágicas fluorescentes con propiedades mejoradas. Dichos métodos pueden utilizarse para formar múltiples nuevos vectores (convenientemente una biblioteca de nuevos vectores) la totalidad de los cuales puede someterse a ensayo para su capacidad de producir partículas fágicas fluorescentes, preferentemente partículas fágicas fluorescentes mejoradas.

Dichas modificaciones, p. ej., en la forma de adición, delección, sustitución o inserción de uno o más nucleótidos (y por lo tanto, aminoácidos codificados) puede tener lugar en cualquiera de los dominios funcionales del vector, es decir, en uno o más (o la totalidad) de las partes del vector codificantes del péptido de señal (preferentemente Tor A, más preferentemente Tor AB7), fluoróforo (preferentemente mNeonGreen), conector entre fluoróforo y pVIII, pVIII, o etiqueta (preferentemente la etiqueta FLAG). Preferentemente, las modificaciones están situadas en una o más (o la totalidad) de las regiones codificantes de fluoróforo (preferentemente, mNeonGreen), conector entre fluoróforo y pVIII o de pVIII. En el caso de que las modificaciones estén localizadas en la región codificante de pVIII, en algunas realizaciones las mutaciones están localizadas en la mitad N-terminal de pVIII, por ejemplo dentro de los primeros 90 nucleótidos (o los primeros 30, p. ej., los primeros 25 a 28, o 25 a 30, aminoácidos de pVIII).

Dichas modificaciones o mutaciones en un vector parental pueden llevarse a cabo de cualquier manera apropiada utilizando técnicas bien conocidas y documentadas en la técnica, por ejemplo mediante la realización de métodos de mutagénesis aleatoria o dirigida. Preferentemente, las mutaciones realizadas son sustituciones y estas pueden realizarse conveniente y preferentemente mediante mutagénesis aleatoria, en particular en el caso de que se desee generar y cribar múltiples mutantes (p. ej., una biblioteca de mutantes) para seleccionar aquellos que muestren propiedades mejoradas. La mutagénesis aleatoria puede llevarse a cabo de cualquier manera apropiada, p. ej., mediante PCR con tendencia a errores, o utilizando cepas de *E. coli* mutadoras. Una técnica preferente y conveniente se describe en los Ejemplos e implica la incorporación de análogos de dNTP mediante PCR para introducir mutaciones aleatorias en el ADN del vector (p. ej., un fagémido). Se encuentran disponibles kits comerciales para llevar a cabo dicha mutagénesis aleatoria. En realizaciones descritas en otros sitios en la presente memoria, en las que se realizan mutaciones puntuales o solo unas pocas mutaciones (por ejemplo, hasta 5), por ejemplo la mutación de valina a isoleucina (V a I) en la proteína pVIII (o la mutación correspondiente en la secuencia de nucleótidos codificante) tal como se describe en la presente memoria, resulta apropiada la mutagénesis dirigida u otros tipos de mutagénesis en los que la diana pueden ser residuos específicos, que son modificados.

Los nuevos vectores producidos mediante dichos métodos, al transformarlos en una célula huésped apropiada, preferentemente producirán partículas fágicas fluorescentes que presentan propiedades funcionales mejoradas, preferentemente propiedades fluorescentes mejoradas.

De esta manera, la presente invención proporciona adicionalmente vectores variantes o mutados que son capaces de producir partículas fágicas que muestran una mejora en la intensidad de fluorescencia (brillo mejorado) en comparación con la partícula fágica de tipo salvaje o parental de partida original (es decir, la partícula fágica producida por el vector parental no mutado o de tipo salvaje). Dichas mejoras pueden proporcionarse mediante: a) el incremento del número de fluoróforos sobre la superficie de una partícula de bacteriófago, por ejemplo mediante la incorporación o integración incrementada de proteínas de fusión de fluoróforo-pVIII en la superficie/cubierta fágica como una propiedad inherente del ensamblaje de las partículas fágicas del huésped de *E. coli* productor en virtud del fluoróforo que se fusiona con la proteína de cápside vírica (en otras palabras, incrementando el número o número medio de moléculas de fluoróforo-pVIII por partícula), o b) el incremento del brillo del fluorocromo individual, p. ej., incrementando el brillo (intensidad de fluorescencia) intrínseco de la fracción fluorescente en la proteína de fusión, o c) una combinación de a) y b), es decir, el incremento del brillo y del número de fluoróforos. Otra opción, que podría utilizarse por sí sola o en combinación con a) y/o b), sería mejorar la exposición funcional del fluoróforo, p. ej., mejorando (p. ej., haciendo más eficiente) el pliegue o incrementando la solubilidad, ya que la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* frecuentemente resulta en una fracción de productos proteicos traducidos pero no funcionales, p. ej., productos proteicos insolubles. De esta manera, también pueden proporcionarse mejoras mediante el incremento del número de fluoróforos funcionales sobre la superficie fágica.

En el caso de a) no resulta necesario incrementar el brillo de los fluoróforos individuales. De esta manera, este resultado puede conseguirse con fluoróforos que muestren la misma intensidad fluorescente que la molécula de

fluoróforo de partida o, en efecto, incluso puede tolerarse una intensidad fluorescente reducida de las moléculas individuales de fluoróforo, ya que se expondrá un mayor número de moléculas fluorescentes sobre la superficie de cada fago individual, lo que podría compensar dicha reducción.

5 Puede utilizarse cualquier ensayo apropiado para partículas fágicas que contiene vectores mutados que presentan un número incrementado de fluoróforos sobre la superficie del bacteriófago. Por ejemplo, puede utilizarse convenientemente algún tipo de etiqueta detectable (que es detectable sobre la superficie del fago) para llevar a cabo dicho cribado. Preferentemente, dichas etiquetas serán independientes del nivel de fluorescencia mostrado por la fracción fluorescente, de manera que pueda evaluarse una indicación del número de fracción fluorescentes sobre la superficie del fago. El experto en la materia conocerá perfectamente ejemplos de etiquetas detectables. Por ejemplo, puede utilizarse una etiqueta FLAG. La detección puede llevarse a cabo convenientemente utilizando un anticuerpo de la etiqueta en cuestión. FACS, p. ej., utilizando un anticuerpo marcado fluorescentemente, p. ej., un anticuerpo contra la etiqueta FLAG, resulta particularmente preferente, ya que permite más fácilmente cribar partículas individuales mediante monitorización y selección de partículas que se han desplazado en una dirección positiva en el eje de fluorescencia pertinente. Alternativamente a la utilización de una etiqueta detectable, para FACS podrían utilizarse anticuerpos que reconozcan específicamente el fluoróforo, tales como anti-mNeonGreen 32F6 (ChromoTek GmbH) o similares. En el apartado de Ejemplos se muestran métodos de ejemplo, por ejemplo métodos basados en FACS, o metodología similar capaz de medir una señal fluorescente del fluoróforo en cuestión (p. ej., FLISA).

20 En el caso de b) no resulta necesario conseguir un incremento del número de fluoróforos sobre la superficie de una partícula fágica individual. De esta manera, este resultado puede conseguirse con el mismo número de fluoróforos sobre la superficie de una partícula fágica individual o, en efecto, incluso puede tolerarse un número reducido de moléculas de fluoróforo individuales, ya que el incremento del brillo del fluorocromo individual, p. ej., el incremento del brillo (intensidad de fluorescencia) intrínseco de la fracción fluorescente podría compensar dicha reducción.

25 Puede utilizarse cualquier ensayo apropiado para cribar para partículas fágicas que contienen vectores mutados que presentan un brillo incrementado del fluorocromo individual en la proteína de fusión expresada sobre la superficie del bacteriófago. Por ejemplo, puede utilizarse FACS o algún otro tipo de ensayo basado en fluorescencia para medir el nivel de fluorescencia, p. ej., para medir niveles de fluorescencia de las partículas fágicas en solución, en combinación con otro método de cuantificación del fluoróforo, p. ej., la utilización de transferencia western, o la utilización de un anticuerpo contra el fluoróforo, p. ej., el nanocuerpo anti-NeonGreen tal como se utiliza en la separación FACS mostrada en los Ejemplos). FACS resulta particularmente preferente, ya que permite más fácilmente el cribado de partículas individuales mediante monitorización y selección de partículas que se han desplazado en una dirección positiva en el eje de fluorescencia pertinente. En el apartado de Ejemplos se muestran métodos de ejemplo, por ejemplo métodos basados en FACS o FLISA.

Preferentemente, dichos incrementos (y, en efecto, otros incrementos, mejoras o efectos positivos, tal como se menciona en otros sitios en la presente memoria) son incrementos medibles, etc. (según resulte apropiado), más preferentemente son incrementos significativos, preferentemente incrementos estadísticamente significativos, por ejemplo con un valor de probabilidad $\leq 0,05$, en comparación con un nivel o valor de control apropiado (p. ej., en comparación con el nivel de fluorescencia obtenido con un vector no mutado, parental o de tipo salvaje). Los incrementos preferentes de la intensidad de fluorescencia podrían ser incrementos superiores o por lo menos dos o tres veces, p. ej., hasta 5 veces, 10 veces o 20 veces, superiores a la intensidad de fluorescencia del vector parental. Un comparador conveniente o nivel basal para un vector parental que puede utilizarse para evaluar dichos incrementos o mejoras podría ser un vector que comprenda secuencias codificantes de SEC ID n.º E o 20, o SEC ID n.º G o 22, o SEC ID n.º C o 18 (o, en efecto, SEC ID n.º A o 16, K o 26, o M o 28).

Se han desarrollado versiones mutadas de un vector que pueden producir fago fluorescente que expresa una proteína de fusión mNeonGreen-pVIII sobre la superficie, que muestran propiedades de fluorescencia mejoradas. Algunas de estas versiones mutadas muestran un brillo mejorado de la fracción fluorescente mNeonGreen de modo individual (tal como pone de manifiesto un desplazamiento positivo del eje y en los perfiles de FACS mostrados en el Ejemplo 2). Otras de estas versiones mutadas muestran una exposición mejorada, es decir, un número incrementado de fluoróforos, sobre la superficie del bacteriófago (tal como pone de manifiesto un desplazamiento a la derecha a lo largo del eje x en los perfiles de FACS mostrados en el Ejemplo 2, evaluado mediante medición de una etiqueta FLAG con un anticuerpo marcado). Otras de estas versiones mutadas muestran tanto un brillo mejorado de la fracción fluorescente mNeonGreen de modo individual como un número incrementado de fluoróforos sobre la superficie del bacteriófago (tal como pone de manifiesto la presencia de clones en el cuadrante derecho superior de los perfiles de FACS mostrados en el Ejemplo 2).

60 Tal como se ha indicado anteriormente, los residuos mutados que resultan en una fluorescencia mejorada de las partículas fágicas pueden estar localizados en cualquier parte del vector, aunque preferentemente se encuentran en la parte mNeonGreen o la parte pVIII de la proteína de fusión (más preferentemente en la parte pVIII), o en el conector entre mNeonGreen y pVIII. En donde las mutaciones se localizan en la región de pVIII, en algunas realizaciones las mutaciones se localizan en la mitad N-terminal de pVIII, por ejemplo dentro de los primeros 90 nucleótidos (o los primeros 30, p. ej., los primeros 25 a 28 o 25 a 30 aminoácidos de pVIII).

Tal como se ha indicado anteriormente, en realizaciones preferentes de la invención, la secuencia de aminoácidos codificada para la parte mNeonGreen del vector se proporciona mediante la SEC ID n.º 4 (y se proporciona una secuencia de nucleótidos de ejemplo mediante la SEC ID n.º 3). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los residuos mutados que resultan en la fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas se localizan en la parte mNeonGreen del vector, dichos componentes mNeonGreen variantes pueden comprender SEC ID n.º 3 o SEC ID n.º 4, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a las mismas al nivel de nucleótidos o de aminoácidos (p. ej., una identidad de por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º 3 o SEC ID n.º 4 al nivel de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, preferentemente al nivel de aminoácidos. Los componentes mNeonGreen variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de hasta 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de mNeonGreen mutadas son secuencias que contienen hasta 30, p. ej. hasta 25, 20, 15, 12 o 10, p. ej., 1, o hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos alterados en la secuencia de mNeonGreen, p. ej., SEC ID n.º 4.

Tal como se ha indicado anteriormente, en realizaciones preferentes de la invención, la secuencia de aminoácidos codificada para la parte pVIII del vector se proporciona en SEC ID n.º 8 (y se proporciona una secuencia de nucleótidos de ejemplo en SEC ID n.º 7). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los residuos mutados que resultan en la fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas se localizan en la parte pVIII del vector, dichos componentes de pVIII variantes pueden comprender la SEC ID n.º 7 o la SEC ID n.º 8, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a ellas al nivel de nucleótidos o de aminoácidos (p. ej., una identidad de por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º 7 o en la SEC ID n.º 8 al nivel de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, preferentemente al nivel de aminoácidos. Los componentes de pVIII variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de hasta 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de pVIII mutadas son secuencias que contienen hasta 10, p. ej., hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácido alterado en la secuencia de pVIII, p. ej., la SEC ID n.º 8.

Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, aunque pueden estar presentes otros residuos mutados, las secuencias de vector mutadas preferentes contienen una sustitución de valina a isoleucina en el residuo (o posición) 33 de la SEC ID n.º 8, o un residuo correspondiente del mismo (es decir, presenta un residuo de isoleucina en, o que corresponde a, la posición 3 de la SEC ID n.º 8). Más preferentemente, el codón codificante de la isoleucina es ATA. Por ejemplo, un codón de valina GTC puede sustituirse por el codón de isoleucina ATA. De esta manera, en las realizaciones discutidas anteriormente en las que vectores variantes pueden comprender la SEC ID n.º 8 o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 8, o un nivel de mutación de hasta 15 %, o un determinado número, p. ej., hasta 35, de aminoácidos alterados en la SEC ID n.º 8, en realizaciones preferentes está presente este residuo o codón de isoleucina.

Tal como también se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones de la invención los residuos mutados están presentes en la mitad N-terminal de la proteína pVIII., por ejemplo en la secuencia de aminoácidos codificada para la parte pVIII del vector según se proporciona en la SEC ID n.º J o 25 que contiene los primeros 30 aminoácidos de pVIII (con una secuencia de nucleótidos de ejemplo según se proporciona en la SEC ID n.º I o 24, los primeros 90 nucleótidos de pVIII). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los residuos mutados que resultan en la fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas están localizados en la parte pVIII del vector, dichos componentes de pVIII variantes pueden comprender la SEC ID n.º 8 o 24, o la SEC ID n.º J o 25, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a las mismas a nivel de nucleótidos o de aminoácidos (p. ej., una identidad de por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º 8 o 24, o en la SEC ID n.º J o 25 al nivel de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, preferentemente al nivel de aminoácidos. Los componentes de pVIII variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de hasta 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de pVIII mutadas son secuencias que contienen hasta 5, p. ej., hasta 4, 3, 2 o 1 aminoácido alterado en la secuencia de pVIII, p. ej., la SEC ID n.º 7 o 25.

Tal como se ha descrito anteriormente, en realizaciones preferentes de la invención, la secuencia de aminoácidos codificada para la parte de conector del vector (en la presente memoria se hace referencia al conector entre los componentes fluoróforo y pVIII) se proporciona mediante la SEC ID n.º 6 (y se proporciona una secuencia de nucleótidos de ejemplo en la SEC ID n.º 5). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los

residuos mutados que resultan en una fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas están localizados en dicha parte de conector del vector, dichos componentes de conector variantes pueden comprender la SEC ID n.º 5 o la SEC ID n.º 6, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a ellas al nivel de nucleótidos o de aminoácidos (p. ej., una identidad de por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º 5 o la SEC ID n.º 6 al nivel de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, preferentemente al nivel de aminoácidos. Los componentes del conector variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de hasta 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de conector mutadas son secuencias que contienen 1, 2 o 3 aminoácidos alterados en la secuencia del conector, p. ej., la SEC ID n.º 6. En otras realizaciones, no hay mutaciones presentes en la secuencia del conector, p. ej., la SEC ID n.º 6.

Tal como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones de la invención la secuencia de aminoácidos codificada para la parte TorAB7 del vector se proporciona en la SEC ID n.º 2 (y se proporciona una secuencia de nucleótidos de ejemplo en la SEC ID n.º 1). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los residuos mutados que resultan en la fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas están localizadas en la parte TorAB7 del vector, dichos componentes de TorAB7 variantes pueden comprender la SEC ID n.º 2 o la SEC ID n.º 1, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a ellas (p. ej., por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º 1 o la SEC ID n.º 2 al nivel de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, preferentemente al nivel de aminoácidos. Los componentes de TorAB7 variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de hasta 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de TorAB7 mutadas son secuencias que contienen hasta 6, p. ej., hasta 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácido alterado en la secuencia de Tor AB7, p. ej., la SEC ID n.º 2.

En otras realizaciones preferentes de la invención, pueden encontrarse mutaciones en uno o más (o la totalidad) de mNeonGreen, el conector entre mNeonGreen y pVIII, y la región codificante de pVIII. En algunas realizaciones preferentes, las mutaciones pueden encontrarse en la región codificante de pVIII. En donde las mutaciones se localizan en la región de pVIII, en algunas realizaciones las mutaciones se localizan en la mitad N-terminal de pVIII, por ejemplo en los primeros 90 nucleótidos (o los primeros 30, p. ej., los primeros 25 a 28 o 25 a 30 aminoácidos de pVIII). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los residuos mutados que resultan en la fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas se localizan en dichas regiones del vector, dichos vectores variantes pueden comprender la SEC ID n.º A o 16, o la SEC ID n.º C o 18, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º A o 16, o C o 18 (p. ej., una identidad de por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º A o C. Los componentes variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de vector mutadas son secuencias que contienen hasta 30, p. ej., hasta 25, 20, 15, 12 o 10, p. ej., 1, o hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos alterados en la SEC ID n.º A o 16, o C o 18.

Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, aunque pueden estar presentes otros residuos mutados, las secuencias de vector mutado preferentes contienen una sustitución de valina por isoleucina en el residuo 276 de la SEC ID n.º C o 18, o un residuo correspondiente a la misma (es decir, presentan un residuo de isoleucina en, o correspondiente a, la posición 276 de la SEC ID n.º C o 18). Más preferentemente, el codón codificante de la isoleucina es ATA. Por ejemplo, puede sustituirse un codón de valina GTC por el codón de isoleucina ATA. De esta manera, en las realizaciones anteriormente discutidas en las que los vectores variantes pueden comprender la SEC ID n.º C o 18, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º C o 18, o un nivel de mutación de hasta 15 %, o un determinado número, p. ej., hasta 35, de aminoácidos alterados en la SEC ID n.º C o 18, en realizaciones preferentes está presente dicho residuo o codón de isoleucina.

En otras realizaciones preferentes de la invención, pueden encontrarse las mutaciones en uno o más (o la totalidad) de mNeonGreen, el conector entre mNeonGreen y pVIII, la región codificante de pVIII, y el péptido de señal TorAB7. En algunas realizaciones preferentes, las mutaciones pueden encontrarse en la región codificante de pVIII.

En donde las mutaciones se localizan en la región pVIII, en algunas realizaciones las mutaciones están localizadas en la mitad N-terminal de pVIII, por ejemplo dentro de los primeros 90 nucleótidos (o los primeros 30, p. ej., los primeros 25 a 28, o los 25 a 30 aminoácidos de pVIII). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los residuos mutados que resultan en la fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas se localizan en dichas regiones del vector, dichos vectores variantes pueden comprender SEC ID n.º E o 20, o SEC ID n.º K o 26, o

una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a SEC ID n.º E o 20, o SEC ID n.º K o 26 al nivel de aminoácidos (p. ej., una identidad de por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º E o 20, o en la SEC ID n.º K o 26. Los componentes variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de vector mutadas son secuencias que contienen hasta 35, p. ej., hasta 30, 25, 20, 17, 15, 12 o 10, p. ej., 1, o hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos alterados en la SEC ID n.º E o 20, o K o 26.

Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, aunque pueden estar presentes otros residuos mutados, las secuencias de vector mutado preferentes contienen una sustitución de valina por isoleucina en el residuo 317 de la SEC ID n.º E o 20, o un residuo correspondiente a la misma (es decir, presentan un residuo de isoleucina en, o correspondiente a, la posición 317 de la SEC ID n.º E o 20). Más preferentemente, el codón codificante de la isoleucina es ATA. Por ejemplo, puede sustituirse un codón de valina GTC por el codón de isoleucina ATA. De esta manera, en las realizaciones anteriormente discutidas en las que los vectores variantes pueden comprender la SEC ID n.º E o 20, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º E o 20, o un nivel de mutación de hasta 15 %, o un determinado número, p. ej., hasta 35, de aminoácidos alterados en la SEC ID n.º E o 20, en realizaciones preferentes está presente dicho residuo o codón de isoleucina.

En otras realizaciones preferentes de la invención, pueden encontrarse mutaciones en uno o más (o la totalidad) de mNeonGreen, el conector entre mNeonGreen y pVIII, la región codificante de pVIII, el péptido de señal TorAB7 y la secuencia FLAG.

En donde las mutaciones se localizan en la región pVIII, en algunas realizaciones las mutaciones están localizadas en la mitad N-terminal de pVIII, por ejemplo dentro de los primeros 90 nucleótidos (o los primeros 30, p. ej., los primeros 25 a 28, o los 25 a 30 aminoácidos de pVIII). De esta manera, en realizaciones en las que por lo menos algunos de los residuos mutados que resultan en la fluorescencia conservada o mejorada de las partículas fágicas se localizan en dichas regiones del vector, dichos vectores variantes pueden comprender SEC ID n.º G o 22, o SEC ID n.º M o 28, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a SEC ID n.º G o 22, o SEC ID n.º M o 28 (p. ej., una identidad de por lo menos 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %). En otras palabras, dichos componentes variantes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en la SEC ID n.º G o 22, o en la SEC ID n.º M o 28. Los componentes variantes preferentes pueden comprender un nivel de mutación de hasta 15 %, preferentemente de 13 % o 10 %, más preferentemente de hasta 5 % o 4 %.

Otros ejemplos preferentes de secuencias de vector mutadas son secuencias que contienen hasta 35, p. ej., hasta 30, 25, 20, 17, 15, 12 o 10, p. ej., 1, o hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos alterados en la SEC ID n.º G o 22, o M o 28.

Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, aunque pueden estar presentes otros residuos mutados, las secuencias de vector mutado preferentes contienen una sustitución de valina por isoleucina en el residuo 325 de la SEC ID n.º G o 22, o un residuo correspondiente a la misma (es decir, presentan un residuo de isoleucina en, o correspondiente a, la posición 325 de la SEC ID n.º G o 22). Más preferentemente, el codón codificante de la isoleucina es ATA. Por ejemplo, puede sustituirse un codón de valina GTC por el codón de isoleucina ATA. De esta manera, en las realizaciones anteriormente discutidas en las que los vectores variantes pueden comprender la SEC ID n.º G o 22, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º G o 22, o un nivel de mutación de hasta 15 %, o un determinado número, p. ej., hasta 35, de aminoácidos alterados en la SEC ID n.º G o 22, en realizaciones preferentes está presente dicho residuo o codón de isoleucina.

En dichas realizaciones en las que los vectores contienen una etiqueta FLAG, resulta preferente que la etiqueta FLAG se mantenga sin modificar o no mutada, p. ej., que conserve la secuencia de SEC ID n.º 10 (DYKDDDDK).

En realizaciones particularmente preferentes, los vectores de la invención contienen mutaciones tales que las secuencias mutadas o variantes muestran una eficiencia o velocidad de traducción reducida o significativamente reducida, o más débil o disminuida. De esta manera, los constructos de vector en los que la eficiencia de traducción de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII es baja, débil, reducida, disminuida o no óptima resultan generalmente preferentes. Las modificaciones/moléculas variantes preferentes son aquellas en las que la eficiencia de traducción, por ejemplo y en particular de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, es reducida o significativamente reducida (o disminuida), por ejemplo en comparación con la secuencia parental original (no mutada o no modificada), los ejemplos específicos de la cual se describen en otros sitios en la presente memoria. A título de ejemplo, lo anterior puede conseguirse disponiendo de un componente pVIII mutado, de manera que la eficiencia de traducción de la proteína pVIII (y, por lo tanto, todo el ORF que contiene la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII) esté reducida o significativamente reducida. Sin embargo, igualmente se contempla que mutaciones en otras partes de la proteína de

fusión de fluoróforo-pVIII, p. ej., en el fluoróforo (p. ej., el fluoróforo mNeonGreen) o en la secuencia de conector, o en el péptido de señal, puedan resultar en una eficiencia de traducción reducida.

Las variantes con una eficiencia de traducción reducida pudieron cribarse o someterse a ensayo mediante métodos apropiados concebidos o conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, podría llevarse a cabo un ensayo de seguimiento del curso temporal del número normalizado de células huésped y de la producción de proteínas cuantificada por un medio independiente de la funcionalidad de la proteína, p. ej., mediante un ensayo de transferencia western, con el fin de evaluar si la cantidad absoluta de proteínas es inferior en el sistema a ensayo para una eficiencia de traducción reducida en comparación con un control relevante (p. ej., una proteína de fusión no variante o de tipo salvaje).

Preferentemente, dichas reducciones (y, en efecto, otras disminuciones, reducciones o efectos negativos mencionados en otros sitios de la presente memoria) son reducciones medibles, etc. (según el caso), más preferentemente son reducciones significativas, preferentemente reducciones estadísticamente significativas, por ejemplo con un valor de probabilidad $\leq 0,05$, en comparación con un nivel o valor de control apropiado (p. ej., en comparación con el nivel de traducción, p. ej., la eficiencia o velocidad de traducción, obtenido con un vector no mutado, parental o de tipo salvaje, u otro control relevante).

Sin respaldo teórico, se cree que dicha eficiencia o velocidad de traducción reducida, y por ejemplo, la acumulación más gradual o más lenta de proteína de fusión en la célula huésped, eventualmente resulta en la incorporación de más copias de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII en la cubierta del fago en comparación con un constructo de vector (p. ej., un constructo parental, ejemplos específicos del cual se describen en otros sitios de la presente memoria) en el que se observa una eficiencia de traducción normal o elevada. alternativamente, el número de fusiones de fluoróforo funcional en la cubierta del fago se incrementa sin modificar necesariamente el número absoluto de unidades incorporadas. Debido a que uno de los objetivos de la invención es incrementar la fluorescencia de la partícula fágica mediante el incremento del número de proteínas de fusión de fluoróforo-pVIII incorporadas en la cubierta (sobre la superficie) del fago o mediante el incremento del número de proteínas de fusión funcionales sobre la superficie del fago, es algo inesperado que en algunas realizaciones una eficiencia de traducción reducida, en particular de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, produzca mejores resultados, p. ej., en términos de mejor exposición funcional de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, y/o de exposición incrementada (p. ej., más copias por partícula) de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, que en este caso puede resultar en una fluorescencia incrementada de las partículas fágicas.

Un ejemplo de una mutación que resulta en una fluorescencia mejorada de las partículas fágicas es la modificación de una V a una I en el residuo 33 de la proteína pVIII mostrada en la SEC ID n.º 8. Esta mutación se encuentra en el clon F03 tal como se describe en los Ejemplos, que se muestra que presenta una fluorescencia mejorada en comparación con la secuencia parental, o en otras palabras, en comparación con una secuencia que no presenta la mutación V a I en dicha posición. Curiosamente, al examinar la secuencia de ácidos nucleicos, el codón codificante de la valina en la posición 33, GTC, en la pVIII parental/de tipo salvaje/no modificada, se ha modificado al codón codificante de isoleucina, ATA. Este es un codón extremadamente raro en *E. coli* y, de esta manera, se cree que contribuye a la eficiencia de traducción significativamente reducida de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII en el clon F03. De esta manera, otras mutaciones adecuadas serían aquellas que resultan en la incorporación de codones raros (codones que son raros en *E. coli*), tales como ATA, en la secuencia de ácidos nucleicos (T evidentemente sería U en una secuencia de ARN correspondiente). Los codones raros apropiados serían bien conocidos por el experto en la materia; sin embargo, algunos ejemplos podrían ser codones de Arg raros, tales como AGG, CGA, AGA o CGG, o CTA (Leu), CCC (Pro) o TCG (Ser). Otro ejemplo podría ser intercambiar el codón de partida/inicio ATG normal por un codón más raro, p. ej., el codón más raro GTG.

Tal como puede observarse a partir de los Ejemplos experimentales, la presencia de la mutación V a I en esta posición, por ejemplo mediante la presencia del cambio del codón de valina GTC por el codón de isoleucina ATA, resulta en una fluorescencia significativamente mejorada, por ejemplo del orden de 2 veces más alta (o 100 % más alta) que la fluorescencia observada con la secuencia de pVIII de tipo salvaje/parental/no modificada. La fluorescencia observada ya era brillante. En efecto, se cree que la fluorescencia conferida por la expresión del vector parental mostró la fluorescencia más brillante para una partícula fágica conocida de la técnica. De esta manera, duplicar dicha fluorescencia es una mejora significativamente ventajosa.

De esta manera, tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, aunque pueden estar presentes otros residuos mutados, las secuencias de vector mutado preferentes presentan una secuencia de pVIII que contiene una sustitución de valina por isoleucina en el residuo 33 de la SEC ID n.º 8 o un residuo correspondiente al mismo (es decir, presenta un residuo isoleucina en, o correspondiente a, la posición 33 de la SEC ID n.º 8). Más preferentemente, el codón codificante de la isoleucina es ATA. Por ejemplo, un codón de valina GTC puede sustituirse por el codón de isoleucina ATA. De esta manera, en las realizaciones descritas en otros sitios en la presente memoria en las que los vectores variantes pueden comprender la SEC ID n.º 8 o una variante de la misma, por ejemplo una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 8 o un nivel de mutación de hasta 15 %, o un número determinado, p. ej., de hasta 35 aminoácidos alterados en la SEC ID n.º 8, en realizaciones preferentes dicho residuo o codón de isoleucina está presente. De esta manera, en constructos de vector preferentes, la proteína de cubierta

fágica pVIII o secuencia variante contenida (o codificada) en los vectores presenta una mutación de valina a isoleucina (un residuo isoleucina) en la posición 33 de la SEC ID n.º 8 o en una posición correspondiente. Preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicho residuo de isoleucina comprende el codón ATA.

Igualmente, aunque pueden estar presentes otros residuos mutados, al nivel de nucleótidos las secuencias de vector mutadas preferentes codificantes de la proteína pVIII contienen una sustitución de GTC por ATA en los residuos 97 a 99 de la SEC ID n.º 7, o residuos correspondientes a la misma. De esta manera, en las realizaciones descritas en otros sitios en la presente memoria en las que vectores variantes pueden comprender la SEC ID n.º 7, o una variante de la misma, por ejemplo una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 7, entonces, en realizaciones preferentes, está presente dicho codón ATA codificante de isoleucina.

De esta manera, los constructos de vector preferentes comprenden una proteína de cubierta fágica pVIII que comprende la SEC ID n.º 61, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 61. Alternativamente, la proteína de cubierta fágica pVIII está codificada por una secuencia que comprende la SEC ID n.º 60, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 60.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína pVIII codificada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de por lo menos 70 %, 75 % u 80 % respecto a la SEC ID n.º 61, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Tal como se ha indicado anteriormente, dichas secuencias de pVIII variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de exponer un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII. También podrían utilizarse truncados o fragmentos funcionales de la SEC ID n.º 61 (o dichas secuencias homólogas) u otras secuencias de pVIII, siempre que se conserve la capacidad de exponer un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII.

Igualmente, la molécula de ácidos nucleicos codificante de la proteína pVIII comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de por lo menos 70 %, 75 % u 80 % respecto a la SEC ID n.º 60, tal como una identidad de por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Estas secuencias de nucleótidos de pVIII variantes deben conservar o presentar la capacidad funcional de codificar un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII que pueda exponerse sobre una partícula fágica. También podrían utilizarse truncados o fragmentos funcionales de la SEC ID n.º 60 (o dichas secuencias homólogas) u otras secuencias de pVIII, siempre que se conserve la capacidad de codificar un fluoróforo en forma de una proteína de fusión de pVIII que pueda exponerse sobre una partícula fágica.

El clon F03 tal como se muestra en los Ejemplos comprende una secuencia TorAB7 de SEC ID n.º 2, una etiqueta FLAG de SEC ID n.º 10, un fluoróforo mNeonGreen de SEC ID n.º 4, una secuencia de conector de SEC ID n.º 6 y una proteína de cubierta fágica pVIII de SEC ID n.º 61 (codificada por la SEC ID n.º 60). De esta manera, los vectores que comprendan o codifiquen una o más, o la totalidad, de las secuencias resultan preferentes, aunque la etiqueta FLAG es opcional. Los vectores que comprendan secuencias codificantes de un fluoróforo mNeonGreen de SEC ID n.º 4, una secuencia de conector de SEC ID n.º 6 y una proteína de cubierta fágica pVIII de SEC ID n.º 61 (codificada por la SEC ID n.º 60) resultan preferentes, al igual que los vectores que comprenden las secuencias mostradas en la figura 9, pero en las que la proteína de cubierta fágica pVIII presenta o comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º 61 (codificada por la SEC ID n.º 60). Las variantes con una identidad de por lo menos 70 % respecto a una o más, o la totalidad, de dichas secuencias también se encuentran contempladas, tal como se describe en otros sitios en la presente memoria. Sin embargo, en dichas secuencias variantes, resulta preferente que esté presente un residuo de isoleucina en el residuo 33 (o residuos correspondientes) de SEC ID n.º 61, o su secuencia variante. También resulta preferente que dicho residuo de isoleucina esté codificado por el codón ATA (tal como se encuentra en la SEC ID n.º 60).

En algunas otras realizaciones, la utilización de una variante que muestre una eficiencia de traducción reducida de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII por las mutaciones en los componentes de pVIII (u otros) de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII (o ácido nucleico codificante) tal como se ha discutido anteriormente, en particular las variantes/mutantes de V a I, puede combinarse con otras características que resulten en una eficiencia de traducción reducida de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, tal como la utilización de una secuencia SD débil (o una secuencia RBS débil) en el constructo de vector cadena arriba de la secuencia codificante de ORF que comprende el péptido de señal Tat y la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII tal como se describe en otros sitios en la presente memoria.

Los vectores preferentes de la invención pueden codificar una fusión de una segunda proteína de cubierta fágica que comprende una proteína de interés (PDI) o unidad de direccionamiento fusionada con una proteína de cubierta fágica diferente de pVIII. Dichas segundas fusiones de proteína e cubierta fágica preferentemente se proporcionan en el mismo vector que la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII. Sin embargo, la fusión de la segunda proteína de cubierta puede proporcionarse en un vector separado. Las proteínas de cubierta fágica no pVIII de ejemplo serán bien conocidas por el experto en la materia, por ejemplo puede utilizarse una fusión a pIII, pVI, pVII o pIX. Dichas realizaciones permiten la exposición de una PDI, p. ej., una proteína de direccionamiento, y un fluoróforo en dos proteínas de cubierta diferentes de una partícula fágica simultáneamente. Las segundas fusiones preferentes serían de una proteína de interés (PDI) o unidad de direccionamiento a pIX.

Los vectores de la invención pueden comprender adicionalmente, de esta manera, una secuencia (una secuencia de ácidos nucleicos) codificante de una PDI fusionada (fusionada genéticamente) a una secuencia codificante de una proteína de cubierta fágica no pVIII. La PDI y la proteína de cubierta fágica no pVIII puede encontrarse en cualquier orden o espaciado en el vector, siempre que, una vez expresada y empaquetada en partículas fágicas, se forme una proteína de fusión funcional entre la PDI y la proteína de cubierta no pVIII, en donde el componente de proteína de cubierta no pVIII de la proteína de fusión forme parte de la cubierta fágica y la PDI se exprese funcionalmente o se exponga sobre la superficie de la partícula fágica. La parte PDI de la proteína de fusión de esta manera está posicionada en el mismo marco de la parte proteína de cubierta no pVIII de la proteína de fusión. En los vectores de la invención, el componente PDI de la segunda proteína de fusión puede posicionarse N-terminalmente (o en o en proximidad al extremo N-terminal) o C-terminalmente (o en o en proximidad al extremo C-terminal) al componente proteína de cubierta fágica no pVIII de la segunda proteína de fusión. Lo anterior generalmente se determinará basándose en el tipo de proteína de cubierta fágica no pVIII utilizada y resultará fácilmente evidente para el experto en la materia.

En realizaciones en las que se utilice la fusión de una PDI a una segunda proteína de cubierta fágica, resulta preferente que cada una de las fusiones de proteína de cubierta (es decir, la fusión de pVIII y de proteína no pVIII) se exprese como un marco de lectura abierta separado. De esta manera, en dichas realizaciones, los vectores pueden contener dos sitios de unión ribosómica (RBS) o regiones SD o TIR separados: uno que dirija la traducción de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII y el otro que dirija la traducción de la proteína de fusión de PDI-segunda proteína de cubierta. Puede utilizarse cualquier RBS, etc. apropiado para dirigir la traducción de la proteína de fusión de PDI-segunda proteína de cubierta (p. ej., secuencias fuertes, débiles o de consenso tal como se describen en otros sitios en la presente memoria). Las secuencias RBS para las dos fusiones de proteína de cubierta, de esta manera, pueden ser iguales o diferentes y se describen ejemplos en otros sitios de la presente memoria.

En la figura 2 se muestra una estructura de ejemplo de dicho constructo con dos proteínas de fusión.

En dichos vectores las secuencias codificantes de las dos proteínas de fusión pueden encontrarse en cualquier orden, aunque en algunas realizaciones la proteína de fusión de PDI se posiciona N-terminalmente respecto a la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII.

Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, puede incluirse una secuencia de señal o un péptido de señal en el ORF para la proteína de fusión no pVIII. Ello dependerá en gran medida del tipo de proteína de fusión no pVIII que se esté utilizando. Una proteína de fusión pIII generalmente requerirá un péptido de señal, mientras que un péptido de señal es opcional para las proteínas de fusión pVII y pIX (es decir, puede estar presente o estar ausente), mientras que generalmente no se utilizarán secuencias de señal para pVI. Por ejemplo, pVI se utiliza generalmente en forma de una fusión C-terminal. En algunas realizaciones de la invención en las que se utiliza un segundo péptido de señal, se utilizará un péptido de señal diferente de Tat.

En dichas realizaciones también resulta preferente que ambas fusiones de proteína de cubierta se expresen bajo el control de la misma secuencia de promotor, aunque en otras realizaciones podrían utilizarse secuencias de promotor separadas o diferentes (p. ej., 2). Las secuencias de promotor de ejemplo serán bien conocidas por el experto en la materia y podría utilizarse cualquiera de ellas. Una secuencia de promotor de ejemplo podría ser un promotor lac que puede inducirse, por ejemplo, con IPTG. Entre otros promotores puede incluirse tac, arabB o psp.

Resulta importante que los resultados mostrados en la presente memoria demuestran que la expresión de la proteína de fusión de pVIII-fluoróforo sobre la superficie fágica no interfieran con la capacidad de unión de una PDI, y en particular una proteína de direccionamiento (p. ej., la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo), expuesto sobre una proteína de cubierta diferente en la misma partícula fágica, p. ej., pIX. De esta manera, puede utilizarse la proteína de fusión de pVIII-fluoróforo junto con la expresión de una proteína de interés en cualquier otra proteína de cubierta fágica.

Puede codificarse cualquier proteína de interés (PDI) en los vectores de la invención siempre que resulte adecuada para la exposición sobre el fago. Son ejemplos preferentes, las moléculas de direccionamiento/unidades de direccionamiento o parejas de unión que puedan unirse para (direccionarse a) otras entidades. Algunos ejemplos preferentes de PDI serían anticuerpos o fragmentos de los mismos (p. ej., Fab, scFv o nanocuerpos), moléculas de CMH (de clase I o II), receptores de células T o proteínas de unión no derivadas de Ig, tales como DARpins, la familia de la anquirina, la familia de la fibronectina, las knotinas, las anticalinas, etc. (Hosse et al., 2006, Protein Sci. 15:14-27) y péptidos.

Los vectores de la presente invención pueden utilizarse para la exposición fágica clásica con el fin de seleccionar las parejas de unión (p. ej., anticuerpos) para una entidad diana particular, p. ej., una proteína diana. En dichas aplicaciones, puede expresarse una biblioteca de PDI sobre las partículas fágicas como parte de la proteína de fusión de no pVIII (la fusión de una segunda proteína de cubierta) y seleccionarse para la unión a una entidad diana mediante técnicas estándares y bien conocidas. La fluorescencia detectable de la superficie fágica proporcionada por la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII puede utilizarse para el cribado y la detección.

De esta manera, la PDI normalmente es exógena o heteróloga, como efectivamente el fluoróforo. Al hacer referencia a una proteína exógena o heteróloga, se pretende aludir a una proteína o péptido que no es originalmente parte de la proteína de cubierta fágica relevante, p. ej., la proteína pIII, pVI, pVII, pIX o pVIII, etc., que está fusionada (con o sin ningún aminoácido conector) a una proteína de cubierta fágica (o fragmento de la misma), p. ej., fusionado al extremo N-terminal de la proteína de cubierta fágica.

Otras características opcionales que pueden estar presentes en los vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) de la invención serían bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, los vectores, p. ej., los vectores fágicos o los vectores fagémidos (que pueden denominarse colectivamente, vectores o constructos de exposición fágica) opcionalmente pueden contener adicionalmente otros componentes apropiados, por ejemplo orígenes de replicación, promotores/operadores inducibles o no inducibles para iniciar la transcripción, intensificadores, secuencias de terminación, genes de resistencia a antibióticos y marcadores, secuencias codificantes de proteínas chaperonas (p. ej., proteínas chaperonas periplásmicas, tales como FkpA), secuencias de señal, conectores, sitios de proteasa, etiquetas generales o moléculas informadoras, sitios de restricción para permitir la clonación y otras manipulaciones, sitios de unión de cebador para permitir la amplificación de los constructos mediante, p. ej., PCR, u otros elementos de secuencia deseables, por ejemplo, secuencias de ADN para permitir la discriminación entre diferentes bibliotecas mediante, p. ej., PCR. Las fuentes y posicionamiento apropiados de dichos componentes adicionales dentro de los constructos de exposición fágica para que lleven a cabo su función deseada se encontrarían perfectamente comprendidas dentro de la práctica normal del experto en la materia.

Los huéspedes bacterianos apropiados para la exposición fágica que pueden utilizarse para expresar los vectores y secuencias de ácidos nucleicos de la invención y para empaquetar y producir partículas fágicas fluorescentes son bien conocidos por el experto en la materia y podrían seleccionarse correspondientemente. Las células huésped bacterianas preferentes son bacterias gram-negativas tales como cepas de *E. coli*. Entre las cepas de *E. coli* de ejemplo se incluirían XL-1 blue, TG1, ER2738, AVB100FmkII', MC1061, SS320 y TOP10F'. En algunas realizaciones resultan preferentes las cepas de XL-1 blue.

Los huéspedes bacterianos preferentes, p. ej., los huéspedes *E. coli*, para la utilización en la presente invención son huéspedes que han sido manipulados para sobreexpresar la proteína transportadora Tat, o componentes de la proteína transportadora Tat, por ejemplo la sobreexpresión de las proteínas Tat A, Tat B y Tat C. Los métodos para dicha sobreexpresión son bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo mediante la expresión de componentes de la proteína transportadora Tat, p. ej., por lo menos las proteínas Tat A, Tat B y Tat C en vectores de expresión. Las secuencias y fuentes de dichos componentes, p. ej., las proteínas Tat A, Tat B y Tat C, se encuentran fácilmente disponibles en la técnica, p. ej., a partir de bases de datos estándares. Se muestra un método de ejemplo en los Ejemplos adjuntos. Estas células huésped pueden entonces transfectarse o alternativamente proporcionarse con los vectores de la invención, y utilizarse para producir partículas fágicas fluorescentes.

Tal como se muestra en los Ejemplos experimentales, la utilización de dichos huéspedes puede permitir la producción de una fluorescencia mejorada (una intensidad de fluorescencia incrementada) de las células bacterianas que expresan las partículas fágicas, además de una fluorescencia mejorada (una intensidad de fluorescencia incrementada) de las partículas fágicas producidas y secretadas por las células huésped, p. ej., en comparación con la fluorescencia observada al utilizar una célula huésped bacteriana sobreexpresante de un transportador no Tat. Esta fluorescencia mejorada puede ser significativa, por ejemplo los incrementos observados y preferentes de intensidad de fluorescencia pueden ser incrementos superiores o de por lo menos dos veces o tres veces, p. ej., de hasta 5 veces, 10 veces, 20 veces o 30 veces la fluorescencia observada al utilizar una célula huésped sobreexpresante de transportador no Tat.

Dichas células huésped bacterianas, p. ej., *E. coli*, p. ej., XL-1 blue u otras indicadas en la presente memoria, manipuladas para expresar o sobreexpresar heterológicamente la proteína transportadora Tat, p. ej., para expresar o sobreexpresar heterológicamente por lo menos las proteínas Tat A, Tat B y Tat C, forma un aspecto todavía adicional de la invención.

Tal como se describe en otros sitios de la presente memoria, los vectores de la invención se utilizan para la exposición fágica y, por lo tanto, pueden ser vectores fagémidos o vectores fágicos.

La exposición fágica es una técnica que es bien conocida y descrita en la técnica. A este respecto, en 1985, G.P. Smith estableció un método para exponer polipéptidos sobre la superficie de un fago filamentoso, un virus que infecta las células de *E. coli* (Smith, G.P., 1985, Science 228, 1315-1317). Desde entonces la denominada exposición fágica ha evolucionado para convertirse en una tecnología potente para la ingeniería de proteínas y la selección de péptidos y proteínas de unión a una diana específica (Løset y Sandlie, 2012, Methods 58, 40-46). El fago filamentoso M13 está constituido de cinco proteínas estructurales diferentes. La proteína VIII (pVIII) es la proteína de cubierta principal y la partícula presenta una caperuza en un extremo de 3 a 5 copias de pIII y pVI, y en el otro extremo, de 3 a 5 copias de pVII y pIX. La partícula infecta las células de *E. coli* que presentan fimbrias F, mediante pIII, e inyecta su ADN de cadena sencilla (ADNcs) en la célula bacteriana. En ella, se replica y transcribe el ADN fágico, y se ensamblan nuevas partículas fágicas antes de la secreción no lítica al medio de cultivo.

En la exposición fágica, normalmente se introduce un gen codificante de una proteína de interés (PDI) entre un gen codificante de una proteína de cubierta (con frecuencia pIII) y su secuencia de señal N-terminal, para producir una fusión de PDI-proteína de cubierta, aunque en algunas realizaciones de la presente invención no siempre hay presentes secuencias de señal. La expresión "biblioteca fágica" se refiere a una colección de fagos únicos que difiere en su secuencia de aminoácidos respecto a la PDI, y se prepara mediante técnicas de clonación molecular estándares. Una biblioteca puede contener normalmente $>10^{10}$ miembros y puede utilizarse para la selección de ligantes específicos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona, de esta manera, una biblioteca de fagos fluorescentes, p. ej., fagos filamentosos fluorescentes, producidos y, por lo tanto, que comprenden los vectores (o moléculas e ácidos nucleicos) de la invención tal como se describe en la presente memoria. Dichos fagos fluorescentes comprenden proteínas de fusión de fluoróforo-pVIII. Opcionalmente dichos fagos filamentosos también exponen una PDI o una biblioteca de PDI en forma de fusiones a pIII, pVI, pVII o pIX. Al igual que con otras bibliotecas de exposición fágica, cada partícula fágica individual expresa/expone la misma PDI, aunque la presencia de múltiples partículas permite la exposición de múltiples (o una biblioteca o una pluralidad) de diferentes PDI.

Para aspectos de la invención que implican la exposición fágica, puede hacerse referencia a un libro de texto sobre exposición fágica de uso general, tal como "Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery", de Sachdev S. Sidhu, 1995, o "Phage Display: A Laboratory Manual", de Barbas et al., 1994, para obtener técnicas y definiciones relevantes.

Las fusiones de fluoróforo y PDI-proteína de cubierta puede estar codificadas en un genoma fágico completo mediante inserción de las secuencias codificantes del fluoróforo o la PDI en las secuencias codificantes de la proteína de cubierta relevante en el genoma fágico (exposición del vector fágico) o sobre un fagémico (exposición en fagémido). Un fagémido es un plásmido de alto número de copia que puede codificar la fusión fluoróforo-pVIII y opcionalmente la proteína de fusión de PDI-proteína de cubierta no pVIII, y se requiere la superinfección con un fago ayudante que proporcione el material genético requerido para la producción fágica. De esta manera, en la exposición en fagémido, existen generalmente dos fuentes de la proteína de cubierta que se utilizan para la exposición del fluoróforo y opcionalmente, la PDI; la proteína de tipo salvaje codificada en el fago ayudante y la fusión fluoróforo-pVIII, y opcionalmente la fusión de PDI-proteína de cubierta, codificada en el fagémido. Los nuevos viriones en este caso presentan una mezcla de fusiones de fluoróforo-pVIII/PDI-proteína de cubierta no pVIII y proteínas de cubierta de tipo salvaje. De manera similar, en el caso de que se utilice un sistema genómico de fago, generalmente también necesitan estar presentes las proteínas fágicas de tipo salvaje, aunque en algunas realizaciones de la presente invención no está presente el tipo salvaje de la PDI-proteína de cubierta no pVIII.

Sin embargo, en la presente invención, resulta posible manipular las partículas fágicas para que presenten una o múltiples copias de la PDI expuestas sobre la proteína de cubierta no pVIII. Ello puede controlarse con el fago ayudante que se utilice, y en realizaciones preferentes de la invención se utilizan partículas fágicas con múltiples copias de la PDI expuesta sobre la proteína de cubierta no pVIII. Lo anterior puede conseguirse de cualquier manera apropiada. Sin embargo, en particular, para incrementar el nivel de exposición y obtener como resultado múltiples copias de la PDI sobre la superficie del fago (lo que también puede incrementar la avidéz de la unión), resulta posible utilizar un tipo modificado de fago ayudante denominado DeltaPhage que permite una exposición de alta valencia sobre pIX. Dichos fagos ayudantes modificados contrastan en su uso con los fagos ayudantes normales, tales como M13K07, VSCSM13, R408 o similares, que solo permite exposiciones de baja valencia.

El fago ayudante denominado DeltaPhage fue desarrollado por Nicolay Rustad Nilssen (Nilssen et al., 2012, Nucleic Acids Research, 40, e120, documento n.º WO 2011/036555). En este fago ayudante, por lo menos una (p. ej., dos) mutaciones *amber* han sido insertadas en proximidad al codón de inicio de pIX, inactivando condicionalmente de esta manera la proteína pIX codificada por el fago ayudante. Si este fago ayudante seguidamente se sobreinfecta en una célula huésped (p. ej., *E. coli*) transformada con un fagémido codificante de una fusión PDI-pIX, entonces en la célula huésped que suprime la mutación *amber* (p. ej., una cepa *supE*⁺), se observa una exposición de valencia intermedia de PDI-pIX, mientras que en una célula huésped que no suprime la mutación *amber* (p. ej., una cepa *supE*⁻), se observa una exposición de alta valencia de PDI-pIX. Lo anterior se debe a que, en las cepas de célula huésped *supE*⁺ (p. ej., *E. coli supE*⁺), se traduce la proteína pXI de tipo salvaje del fago ayudante, proporcionando una exposición de valencia intermedia ya que la proteína pIX de tipo salvaje compite con PDI-pIX para la exposición y se expone una mezcla de ambas. Sin embargo, la producción de pIX de tipo salvaje sobre el fago ayudante resulta bloqueada en las cepas *supE*⁻, y solo estará presente PDI-pIX codificado por el fagémido, dando como resultado una exposición de alta valencia.

De esta manera, en realizaciones preferentes de la invención, el constructo de vector es un vector fagémido que comprende una proteína de fusión de PDI-pIX además de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII, y dicho constructo de vector se utiliza en combinación con un fago ayudante que presenta una mutación condicional, de manera que puede controlarse la expresión de la proteína fágica pIX de tipo salvaje, lo que a su vez puede permitir el control del número de proteínas de fusión de PDI-pIX sobre la superficie del fago. En realizaciones en las que la mutación condicional no se ha suprimido, la proteína pIX de tipo salvaje no se expresará y solo se expresará la fusión PDI-pIX, resultando en únicamente proteínas de fusión PDI-pIX sobre la superficie y una exposición de alta valencia. En

realizaciones en las que se suprima la mutación condicional, se expresará la proteína pIX de tipo salvaje, resultando en una mezcla de pIX de tipo salvaje y proteínas de fusión de PDI-pIX sobre la superficie.

Las mutaciones condicionales adecuadas son bien conocidas por el experto en la materia y podrán diseñarse fácilmente vectores de fago ayudante de manera que la proteína pIX esté bajo el control de la mutación condicional. Por ejemplo, en el fago ayudante denominado DeltaPhage, tal como se ha descrito anteriormente, se utilizan mutaciones condicionales en la forma de uno o más codones de para suprimibles (p. ej., mutaciones *amber*) junto con células huésped apropiadas para suprimir o no suprimir la mutación condicional.

El término "fagémido" es un término de la técnica y se refiere a un tipo de vector de clonación desarrollado como un híbrido entre el fago filamentoso Ff y plásmidos para producir un vector que pueda propagarse en forma de plásmido y también empaquetarse en forma de ADN de cadena sencilla en partículas víricas. De manera similar a un plásmido, puede utilizarse un fagémido para clonar fragmentos de ADN e introducirse en un huésped bacteriano mediante un abanico de técnicas (transformación, electroporación). Sin embargo, la infección de un huésped bacteriano que contiene un fagémido con un fago "ayudante", por ejemplo, VCSM13 o M13K07, proporciona los componentes víricos necesarios para permitir la replicación del ADN de cadena sencilla y el empaquetamiento del ADN de fagémido en partículas fágicas.

Tal como se describe en otros sitios de la presente memoria, otro aspecto de la presente invención proporciona partículas fágicas que comprenden el vector ((o moléculas de ácidos nucleicos) de la invención y que expresan proteínas de fusión de fluoróforo-pVIII funcionales sobre la superficie y que opcionalmente también expresan una segunda proteína de fusión de cubierta que comprende una PDI. Las partículas fágicas pueden comprender, de esta manera, un genoma fágico o un fagémido.

El fago, con frecuencia denominado bacteriófago, se utiliza en la presente memoria en su forma reconocida en la técnica de virus que infecta bacterias, se replica y es secretado por las mismas. Un bacteriófago filamentoso, o fago filamentoso, es un fago con un genoma de ADN de cadena sencilla (genoma de ADNcs) que está empaquetado con proteínas de cubierta fágica. La partícula de fago filamentoso secretada presenta fenotípicamente una estructura filamentosa.

El término "fago", o "fago filamentoso", tal como se utiliza en la presente memoria tanto viriones derivados del genoma fágico como viriones derivados de fagémido.

La expresión "fago ayudante" es una expresión de la técnica y se refiere a un virus que ayuda a un virus independiente y no relacionado que es defectuoso, p. ej., un fagémido, que por sí mismo no constituye un genoma fágico ni un virus funcional, sino meramente un plásmido que contiene uno o varios elementos derivados de un genoma fágico, para reproducir mediante infección la misma célula huésped que ya está ocupada por el virus defectuoso (p. ej., un fagémido) y proporciona las proteínas que el virus defectuoso (p. ej., el fagémido) no tiene y que necesita para completar su ciclo vital y formar viriones, p. ej., que contienen el fagémido.

Los fagos ayudantes preferentes para la utilización en la presente invención se describen en otros sitios en la presente memoria y entre ellos se incluyen M13K07 (Stratagene), Hyperphage (Progen Biotechnik GmbH), R408 (Agilent Technologies) y VCSM13 (Stratagene). En realizaciones preferentes, el fago ayudante puede ser un fago ayudante con una mutación condicional (o suprimible) tal como se ha descrito, p. ej., los constructos DeltaPhage tal como se describen en la presente memoria, o Phaberge, Exphage, VCSM13d3 o R408d3.

Otro aspecto proporcionado por la presente invención es un sistema de exposición fágica que comprende un vector (o molécula de ácidos nucleicos) de la invención. Los sistemas de exposición fágica preferentes comprenden un vector (o molécula de ácidos nucleicos) de la invención, p. ej., un vector fagémido de la invención y un fago ayudante, p. ej., tal como se define en la presente memoria. Otros sistemas de exposición fágica preferentes de la invención comprenden un vector de la invención, p. ej., un vector fagémido de la invención y una célula huésped bacteriana, p. ej., una célula huésped *E. coli*, que sobreexpresa la proteína transportadora Tat, p. ej., que sobreexpresa por lo menos las proteínas Tat A, Tat B y Tat C. Dichas células huésped también se describen en otros sitios en la presente memoria y pueden incluirse como un componente en todos los sistemas de exposición fágica, kits, métodos y usos descritos en la presente memoria.

Otro aspecto descrito en la presente memoria para la utilización en los métodos de la presente invención es un kit que comprende un vector (o molécula de ácidos nucleicos) de la invención o un kit que comprende un sistema de exposición fágica tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo compuesto de un fagémido de la invención y un fago ayudante, preferentemente un fago ayudante tal como se describe en la presente memoria, p. ej., un fago ayudante con una mutación condicional (o suprimible) tal como se describe en la presente memoria, o un kit que comprende un vector de la invención, p. ej., un vector fagémido de la invención, y una célula huésped bacteriana, p. ej., una célula huésped de *E. coli*, que sobreexpresa la proteína transportadora Tat, p. ej., que sobreexpresa por lo menos las proteínas Tat A, Tat B y Tat C. El kit también podría incluir las instrucciones de uso necesarias.

Los vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) preferentes de la invención para la inclusión en dichos kits podrían comprender el vector de fluoróforo-pVIII tal como se describe en la presente memoria que comprende una secuencia codificante de un péptido de señal Tat y una secuencia codificante de una proteína de fusión de fluoróforo-pVIII. Opcionalmente, los vectores (o moléculas de ácidos nucleicos) también podrían comprender una secuencia codificante de una segunda proteína de cubierta fágica (una proteína fágica no VIII), p. ej., tal como se describe en la presente memoria, y uno o más sitios de clonación (p. ej., un sitio de clonación múltiple) adecuados para la clonación de una PDI que entonces se fusionaría con la segunda proteína fágica.

De esta manera, un kit preferente puede comprender o consistir en una colección de reactivos para generar partículas fágicas fluorescentes que comprenden una proteína de fusión de fluoróforo-PVIII, opcionalmente con una segunda proteína de fusión de una PDI con una proteína de cubierta no PVIII. Además del vector de la invención, el kit podría incluir uno o más componentes seleccionados de: otros fagémidos, fagos ayudantes, cepas bacterianas e instrucciones. Las opciones preferentes para dichos componentes adicionales son las descritas en otros sitios de la presente memoria.

Un aspecto todavía adicional de la invención proporciona la utilización de un constructo de vector, una molécula de ácidos nucleicos, un sistema de exposición fágica o un kit de la invención para producir partículas fágicas fluorescentes o para la utilización en la exposición fágica. En otras palabras, la presente invención proporciona un método para producir partículas fágicas fluorescentes (o un método de exposición fágica), en donde dicho método comprende la utilización de un constructo de vector, una molécula de ácidos nucleicos, un sistema de exposición fágica o un kit de la invención.

Las partículas fágicas fluorescentes de la invención tal como se definen en la presente memoria también pueden utilizarse como herramientas moleculares para aplicaciones y ensayos *in vitro*. Las partículas pueden utilizarse en cualquier ensayo en que se desee un reactivo fluorescente detectable.

Debido a que las partículas fágicas preferentes de la invención también exponen una PDI que puede ser una pareja de unión específica o unidad de direccionamiento, p. ej., un anticuerpo, etc., tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, estas pueden funcionar como miembros de parejas de unión específica o reactivos de direccionamiento, y dichas partículas fágicas fluorescentes pueden utilizarse en cualquier ensayo en que se requiera el miembro de pareja de unión o unidad de direccionamiento particular. Entonces puede utilizarse fácilmente el fluoróforo para detectar las partículas y, por lo tanto, para detectar la unión de la PDI a su diana. Cabe destacar que para dichos usos se ha mostrado en la presente memoria que la exposición de la fusión fluoróforo-pVIII sobre la superficie de las partículas fágicas no interfiere con el módulo de direccionamiento expuesto sobre otra proteína de cubierta fágica.

Las partículas fágicas fluorescentes de la invención también pueden utilizarse para cualquier ensayo que implique la detección de fluorescencia, en particular la tinción de fluorescencia (p. ej., en solución o sobre células). De esta manera, los ensayos preferentes para la utilización de las partículas son el análisis de FACS o la inmunofluorescencia o los ensayos FLISA (que presentan un sistema de detección comparable al análisis de FACS). La capacidad de utilizar las partículas en ensayos de inmunofluorescencia o FLISA evita la necesidad de anticuerpos de tinción (o detección), y solo se basa en la fluorescencia inherente de la fusión de fluoróforo-pVIII para la detección. La capacidad de utilizar las partículas en el análisis de FACS proporcionaría la ventaja significativa de poder llevar a cabo una selección en tiempo real (p. ej., una exposición fágica en tiempo real) para evitar la necesidad de anticuerpos de tinción (o de detección), y solo basarse en la fluorescencia inherente de la fusión de fluoróforo-pVIII para la detección. La utilización para el diagnóstico *in vitro* también se encuentra contemplada.

De esta manera, aspectos todavía adicionales de la invención proporcionan un reactivo que comprende partículas fágicas fluorescentes de la invención tal como se definen en la presente memoria y la utilización de dichas partículas fágicas fluorescentes como herramientas moleculares, por ejemplo en ensayos *in vitro*.

Algunas de las secuencias a las que se hace referencia en la presente memoria se resumen en las tablas, a continuación, junto con los identificadores pertinentes.

SEC ID	Descripción	Secuencia
--------	-------------	-----------

n.º		
1 (parte 1 de vector)	Tor AB7 nt (114 residuos)	ATGAACAATAACGATCTCTTTCAGACATCACGTCAGCGTTTTTTGGCAC AACTCGGCGGGCTTAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAAC GCCGCGACGTGCGACT
2	aa (38 residuos)	MNNNDLFQTSRQRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT
3 (parte 2 de vector)	mNG nt (705 residuos)	GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG AACTGCACATCTTCGGTTCATCAACGGTGTTGACTTCGACATG GTTGGTCAGGGTACCGGTAAACCCGAACGACGGTTACGAAGAACTGAACC TGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCC GCACATCGGTTACGGTTTCCAC CAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGG TTGACGGTTCT GGTIACCAGGTTACCGTACCATGCAGTTCGAAGACGGTGCTTCTCTGA CCGTAACTAC CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAG GTACCGGTTTC CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGT GCCGTTCTFAAA AAAACCTACCCGAACGACAAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTT ACACCACCGGT AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTA AACCGATGGCT GCTAACTACCTGAAAAACCAGCCGATGTACGTTTTCCGTAAACCGAAC TGAAACACTCT AAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTCACCGACGTTA TGGGTATGGACGAACTGTACAAA
4	aa (235 residuos)	VSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNP NDGYEELNLK STKGDLQFSP WILVPHIGYG FHQYLPYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRTM QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKGT GPPADGPVMT NSLTAADWCR SKKTYPNDKT IISTFKWSYT TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP MYVFRKTELK HSKTELNFKE WQKAFTDVMG MDELYK
5 (parte 3 de vector)	Conector nt (24 residuos)	GGCGGTGGCAGCGCGGTGGCAGC
6	aa (8 residuos)	GGGSGGGS
7 (parte 4 de vector)	pVIII (M13) nt (150 residuos)	GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAA GCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATG CGTGGGCGATG GTTGTTGTCTATTGTCCGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAAT TCACCTCGAAAGCAAGC
8	pVIII aa	AEGDDP AKAAFNSLQASATEYIGYAW AMVVVIVGAT

	(50 residuos)	IGIKLFKKFT SKAS
9 (parte 5 de vector)	FLAG nt (24 residuos)	GATTACAAGGATGACGATGACAAG
10	aa (8 residuos)	DYKDDDDK
A o 16	Parte 2, 3, parte N-t de 4, (es decir, mNG, conector, 300 aa de pVIII) 273 residuos en total	VSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNP NDGYEELNLK STKGDLQFSP WILVPHIGYG FHQYLPYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRM QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKGT GFPADGPVMT NSLTAADWCR SKKTYPNDKT IISTFKWSYT TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP MYVFRKTELK HSKTELNFKW QKAFDVMG MDELYKGGGS GGSAEGDDP AKAAFNSLQA SATEYIGYAW AMVV
B o 17	secuencia de nt de A	GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG AACTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTGACTTCGACATG GTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGSTTACGAAGAACTGAACC TGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCC GCACATCGGTTACGGTTTCCAC CAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGG TTGACGGTTCT GGTTACCAGGTTACCGTACCATGCAGTTCGAAGACGGTGCTTCTCTGA CCGTTAACTAC CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAG GTACCGGTTTC CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGT GCCGTTCTAAA AAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTT ACACCACCGGT AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTA AACCGATGGCT GCTAACTACCTGAAAAACCAGCCGATGTACGTTTTCCGTAAAACCGAAC TGAAACACTCT AAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTACCGACGTTA TGGGTATGGACGAACTGTACAAA GGCGGTGGCAGCGCGGTGGCAGC GCTG AGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAA GCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGT TGTT
C o 18	Parte 2,3,4 (mNG,	VSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNP NDGYEELNLK STKGDLQFSP

	conector, pVIII completa)	WILVPHIGYG FHQYLPYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRTM QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKGT GFPADGPVMT NSLTAADWCR SKKTYPNDKT IISTFKWSYT TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP MYVFRKTELK HSKTELNFK E WQKAFTDVMG MDELYKGGGS GGSAEGDDP AKAAFNSLQA SATEYIGYAW AMVVVIVGAT IGIKLFKKFT SKAS
	293 residuos en total	
D o 19	secuencia de nt de C	GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG AACTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTGACTTCGACATG GTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAACTGAACC TGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCC GCACATCGGTTACGGTTTCCAC CAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGG TTGACGGTTCT GGTTACCAGGTTACCCGTACCATGCAGTTCGAAGACGGTGCTTCTCTGA CCGTTAACTAC CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAG GTACCGGTTTC CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGT GCCGTTCTAAA AAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTT ACACCACCGGT AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTA AACCGATGGCT GCTAACTACCTGAAAAACCAGCCGATGTACGTTTTCCGTAAAACCGAAC TGAAACACTCT AAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTCACCGACGTTA TGGGTATGGACGAACTGTACAAA GGCGGTGGCAGCGCGGTGGCAGC GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAA GCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATG CGTGGGCGATG GTTGTTGTCAATTGTGCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAAT TCACCTCGAAAGCAAGC
	879 residuos en total	
E o 20	Partes 1,2,3,4 (SIN FLAG)	MNNNDLFQTS RQRFLAQLGG LTVAGMLGPS LLTPRRATAA GVSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNP NDGYEELNLK STKGDQLQFSP WILVPHIGYG FHQYLPYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRTM QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKGT GFPADGPVMT NSLTAADWCR SKKTYPNDKT IISTFKWSYT TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP MYVFRKTELK HSKTELNFK E WQKAFTDVMG MDELYKGGGS GGSAEGDDP AKAAFNSLQA SATEYIGYAW AMVVVIVGAT IGIKLFKKFT SKAS
	(es decir, PorAB7, mNG, conector, pVIII completa)	
	334 residuos en total	
F o 21	secuencia de nt de E	ATGAACAATAACGATCTCTTTTCAGACATCACGTCAGCGTTTTTGGCAC AACTCGGCGGCTTAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAAC GCCGCGACGTGCGACT GCGGCGGGC GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG

		AACTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTTGACTTCGACATG GTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAACTGAACC TGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCC GCACATCGGTTACGGTTTCCAC CAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCAGGCTGCTATGG TTGACGGTTCT GGTTACCAGGTTACCGTACCATGCAGTTCTGAAGACGGTGCTTCTCTGA CCGTAACTAC CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAG GTACCGGTTTC CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGT GCCGTTCTAAA AAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTT ACACCACCGGT AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTA AACCGATGGCT GCTAACTACCTGAAAAACCAGCCGATGTACGTTTTCCGTAAAACCGAAC TGAAACACTCT AAAACCGAACTGAACCTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTCACCGACGTTA TCGGTATGGACGAACGTACAAA GGCGGTGGCAGCGGCGGTGGCAGC GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAA GCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATG CGTGGGCGATG GTTGTTGTCTTGTCTGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAAT TCACCTCGAAAGCAAGC
G o 22	1,2,3,4,5 (es decir, TorAB7, mNG, conector, pVIII completa+ FLAG) 342 residuos en total	MNNNDLFQTS RQRFLAQLGG LTVAGMLGPS LLTPRRATAA DYKDDDDKG VSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNF NDGYEELNLK STKGDQLQFSP WILVPHIGYG FHQYLPYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRTM QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKGT GFPADGPVMT NSLTAADWCR SKKTYPNDKT IISTFKWSYT TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP MYVFRKTELK HSKTELNFKE WQKAFTDVMG MDELYKGGGS GGSAEGDDP AKAAFNSLQA SATEYIGYAW AMVVVIVGAT IGIKLFKKFT SKAS
H o 23	secuencia de nt de G	ATGAACAATAACGATCTCTTTTCAGACATCACGTACGCGTTTTTTGGCAC AACTCGGCGGCTTAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAAC GCCGCGACGTGCGACT GCGGCG GATTACAAGGATGACGATGACAAG GGC GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG AACTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTTGACTTCGACATG GTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAACTGAACC TGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCC GCACATCGGTTACGGTTTCCAC CAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCAGGCTGCTATGG TTGACGGTTCT GGTTACCAGGTTACCGTACCATGCAGTTCTGAAGACGGTGCTTCTCTGA CCGTAACTAC CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAG GTACCGGTTTC CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGT

		GCCGTTCTAAA AAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTT ACACCACCGGT AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTA AACCGATGGCT GCTAACTACCTGAAAAACAGCCGATGTACGTTTTCCGTAAAACCGAAC TGAAACACTCT AAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTCACCGACGTTA TGGGTATGGACGAACTGTACAAA GGCGGTGGCAGCGCGCGGTGGCAGC GCTGAGGGTGACGATCCCCGCAAAA GCGGCCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATG CGTGGGCGATG GTTGTTGTCATTGTGCGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAAT TCACCTCGAAAGCAAGC
I o 24	Primeros 90 nt de pVIII	GCTG AGGGTGACGATCCCGCAAAAAGCGGCCCTTTAACTCCCTGCAA GCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGT TGTT
J o 25	aa correspon- dientes a primeros 90 nt de pVIII	AEGDDP AKAAFNSLQASATEYIGYAW AMVV
K o 26	Partes 1,2,3,4N-t (SIN FLAG) (es decir, TorAB7, mNG, conector, N-t pVIII) 314 residuos	MNNNDLFQTS RQRFLAQLGG LTVAGMLGPS LLTPRRATAA GVSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNP NDGYEELNLK STKGDLLQFSP WILVPHIGYG FHQYLPYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRM QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKGT GFPADGPFMT NSLTAADWCR SKKTPNDKT IISTFKWSYT TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP MYVFRKTELK HSKTELNFKE WQKAFTDVMG MDELYKGGGS GGGSAEGDDP AKAAFNSLQA SATEYIGYAWAMVV
L o 27	secuencia de nt de K	ATGAACAATAACGATCTCTTTTCAGACATCACGTCAGCGTTTTTTGGCAC AACTCGGCGGCTTAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAAC GCCGCGACGTGCGACT GCGGCGGGC GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG AACTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTTGACTTCGACATG GTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAAC'TGAACC TGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCC GCACATCGGTTACGGTTTCCAC CAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGG TTGACGGTTCT GGTTACCAGGTTCAACCGTACCATGCAGTTCGAAGACGGTGCTTCTCTGA CCGTTAACTAC CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAG GTACCGGTTTC CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGT

		GCGGTTCTAAA AAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTT ACACCACCGGT AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTA AACCGATGGCT GCTAACTACCTGAAAAACCAGCCGATGTACGTTTTCCGTAAAACCGAAC TGAAACACTCT AAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTCACCGACGTTA TGGGTATGGACGAACTGTACAAA GGCGGTGGCAGCGCGGTGGCAGC GCTG AGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAA GCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGT TGTT
M o 28	Partes 1,2,3, 4N-t, 5 (es decir, TorAB7, mNG, conector, N-t pVIII + FLAG) 322 residuos	MNNNDLFQTS RQRFLAQLGG LTVAGMLGPS LLTPRRATAA DYKDDDDK GVSKGEEDNM ASLPATHELH IFGSINGVDF DMVGQGTGNP NDGYEELNLK STKGDQLQFSP WILVPHIGYG FHQYLPYPDG MSPFQAAMVD GSGYQVHRTM QFEDGASLTV NYRYTYEGSH IKGEAQVKGT GFPADGPVMT NSLTAADWCR SKKTPNDKT IISTFKWSYT TGNGKRYRST ARTTYTFAKP MAANYLKNQP MYVFRKTELK HSKTELNFKE WQKAFTDVMG MDELYKGGGS GGSAAEGDDP AKAAFNSLQA SATEYIGYAWAMVV
N o 29	secuencia de nt de M	ATGAACAATAACGATCTCTTTTACGACATCACGTACGCGTTTTTGGCAC AACTCGGCGGCTTAACCGTCGCGCGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAAC GCCGCGACGTGCGACT GCGGCG GATTACAAGGATGACGATGACAAG GGC GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG AACTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTTGACTTCGACATG GTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAAGTGAACC TGAAATCTACCAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCC GCACATCGGTTACGGTTTCCAC CAGTACCTGCCGTACCCGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGG TTGACGGTTCT GGTTACCAGGTTACCGTACCATGCAGTTGGAAGACGGTGCTTCTCTGA CCGTTAACTAC CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAG GTACCGGTTTC CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGT GCCGTTCTAAA AAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTT ACACCACCGGT AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTA AACCGATGGCT GCTAACTACCTGAAAAACCAGCCGATGTACGTTTTCCGTAAAACCGAAC TGAAACACTCT AAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTCACCGACGTTA TGGGTATGGACGAACTGTACAAA GGCGGTGGCAGCGCGGTGGCAGC GCTG

		AGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAA GCCTCAGCGACCGAATATATCGGTATGCGTGGGCGATGGT TGTT
30	nt SD débil	AGGAGA
31	nt SD fuerte	<u>TTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT</u>
	nt de secuencia de señal Tor A	
32	aa de Tor A	MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRAT
60	nt de pVIII clon F03	GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAA GCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTATG CGTGGGCGATG GTTGTTGTCTATTATAGGCGCCACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAAT TCACCTCGAAAGCAAGC
61	aa de pVIII clon F03	AEGDDP AKAAFNSLQASATEYIGYAW AMVVVIIGAT IGIKLFKKFT SKAS

Todas las secuencias en dicha tabla se enumeran en la presente memoria en dirección 5' a 3', de acuerdo con la convención en este campo técnico.

5 La invención se describirá en mayor detalle en referencia a los Ejemplos no limitativos siguientes haciendo referencia a los dibujos siguientes, en los que:

10 La figura 1A muestra una vista general esquemática que ilustra algunos de los componentes de los constructos de fagémido de fluoróforo-pVIII descritos en la presente memoria. SD=secuencia de Shine-Dalgarno (que puede ser débil o fuerte); sec. sig=secuencia de señal (mostrada en la presente memoria como TorAB7, pero que puede ser cualquier secuencia de señal que dirija la proteína a la ruta secretoria TAT); FLAG=etiqueta FLAG; pVIII=proteína de cubierta fágica pVIII. Las cajas muestran las variantes de los diversos componentes en las partes SD, sec. sig y fluoróforo del vector que se construyeron y se sometieron a ensayo. Todas las variantes eran idénticas en secuencia excepto por las variaciones indicadas. La figura 1B muestra una representación de una partícula fluorofágica de exposición de fluoróforo-pVIII. Las partículas fágicas presentarán múltiples copias del fluoróforo distribuidas aleatoriamente a lo largo de la longitud de la partícula fágica.

20 La figura 2A muestra una vista general esquemática que ilustra algunos de los componentes de un constructo fagémido de exposición dual descrito en la presente memoria. Lac=promotor lac; SD=secuencia de Shine-Dalgarno; PDI=proteína de interés; pIX=proteína de cubierta fágica pIX; sec. sig.=secuencia de señal; FLAG=etiqueta FLAG; pVIII=proteína de cubierta fágica pVIII. Las cajas muestran las variantes de los diversos componentes en las partes SD, sec. sig. y fluoróforo del vector que se habían construido y sometido a ensayo. Todas las variantes eran idénticas en secuencia excepto por las variaciones indicadas. La figura 2B muestra una representación de una partícula fluorofágica de exposición dual. Las partículas fágicas presentan una o múltiples copias de la PDI expuesta sobre pIX dependiendo del fago ayudante, y múltiples copias del fluoróforo distribuidas aleatoriamente a lo largo de la longitud de la partícula fágica.

30 La figura 3 muestra la tinción de *E. coli* con constructos fagémidos que contienen los fluoróforos mNeonGreen, mCherry m mGFPmut2 fusionados a pVIII. Las células de *E. coli* transformadas se cultivaron durante la noche a 30 °C para permitir la expresión del fluoróforo. Se añadieron los cultivos celulares a portaobjetos de vidrio y se visualizó la fluorescencia utilizando un microscopio confocal. mNeonGreen y eGFPmut2 mostraban una fluorescencia clara y brillante en la mayoría de células. mCherry mostraba una fluorescencia débil pero detectable.

La figura 4 muestra una evaluación de fluorofagos en el rescate de fagémidos. A) Se propagaron seis variantes de los fagémidos fluorofagos que contenían secuencias SD débiles o fuertes, secuencias de señal Tor AB7 o gp8 y fluoróforos mNeonGreen o mGFPmut2, en cultivos de 100 ml de *E. coli* TOP10F' seguido del rescate con los fagos ayudantes M13K07 o DeltaPhage. Los fagos se concentraron mediante precipitación con PEG seguido de titulación infecciosa, y los resultados se expresan en $\text{ufc}^{\text{ampR}}/\text{ml}$. b) Se determinaron las proporciones de fagémido a fago ayudante como $\text{ufc}^{\text{ampR}}/\text{ufc}^{\text{kanR}}$. C) Se normalizaron las partículas fluorofágicas rescatadas a $1 \times 10^{12} \text{ ufc}^{\text{ampR}}$ y se sometieron a ensayo para la fluorescencia en un lector de placas multimarcaje Victor³ utilizando un filtro de FITC. La intensidad de la fluorescencia se expresan en unidades arbitrarias.

La figura 5 muestra una evaluación del efecto sobre la intensidad de fluorescencia de la utilización de diferentes cepas de *E. coli*. A) Se transdujeron cuatro cepas de *E. coli* diferentes con el fluorofago con o sin una etiqueta FLAG y se cultivaron durante la noche y se normalizaron respecto a $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$. Se midió la fluorescencia bacteriana con el lector de placas multimodo Varioskan y se proporciona la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. B) Se analizaron muestras de fluorofagos normalizadas (partículas fluorofágicas) rescatadas utilizando DeltaPhage de cuatro cepas diferentes, para intensidad de fluorescencia en el lector de placas multimodo Varioskan. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias.

La figura 6 muestra la evaluación del rendimiento de fluorofagos en ELISA y FLISA. A) Se analizaron muestras de fagos normalizadas para intensidad de fluorescencia en el lector de placas Victor³ y la intensidad se expresa en unidades arbitrarias. B) Se añadió una serie de dilución de muestras de fago normalizadas a los pocillos, ya sea recubiertos con $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de pHx-BSA o bloqueo con leche. Los fagos capturados se detectaron con mAb anti-M13-HRP y se revelaron con TMB soluble. C) Se analizó la misma serie de dilución para la señal fluorescente en el lector de placas Victor³ en paralelo.

La figura 7 muestra la tinción de fluorofagos de células BW TCR 4B2A1 mediante citometría de flujo. Se utilizó una entrada normalizada de fagos de $5 \times 10^{11} \text{ ufc}/\text{ml}$ en 2×10^5 células en todos los casos. A) Tinción de células BW 4B2A1 transfectadas. Los fagos unidos se detectaron con IgY anti-FD conjugado con PE. B) Tinción de células BW no transfectadas. Los fagos unidos se detectaron con IgY anti-FD conjugado con PE. C) Tinción de células BW 4B2A1. Los fagos unidos se detectaron mediante fluorescencia intrínseca de los fagos. D) Se analizaron muestras normalizadas de fagos para intensidad de fluorescencia en el lector de placas Victor³ y se proporciona la intensidad como unidades arbitrarias.

La figura 8 muestra una vista general de la estrategia de clasificación/separación utilizada con la biblioteca de mutantes. La ronda 1 era una combinación de separación celular y enriquecimiento basado en fagos de los clones con un nivel de exposición elevado. La ronda 2 se centró en los clones con señal de mNeonGreen y niveles elevados de FLAG en superficie (células doblemente positivas). Se analizaron clones individuales mediante secuenciación de Sanger, citometría de flujo y medición de la fluorescencia.

La figura 9 muestra la secuencia del vector FLAG_mNG_pVIII (que es una realización preferente de la invención); la secuencia de nucleótidos se proporciona como la SEC ID n.º 54 y la secuencia de aminoácidos, como la SEC ID n.º 55. Se muestran los componentes TorAB7, FLAG, mNG (mNeonGreen), conector y pVIII de este vector.

La figura 10 muestra la comparación del fluorofago original (mNGwt) con el candidato líder del cribado (mNGF03). (A) Se cultivaron células XL1-blue que contenían los diferentes fagémidos durante 16 horas a 37°C en ausencia de glucosa para permitir la expresión de la proteína de fusión. Las células se lavaron 3x veces en PBS. Se midió la densidad óptica de las células y todas las muestras se ajustaron basándose en la densidad óptica, a un valor de A_{600} de 1. Se preparó una dilución en serie en pasos de 1:2. (B) Los fagos se empaquetaron siguiendo el protocolo estándar utilizando DeltaPhage. Se determinaron las concentraciones de las muestras mediante titulación infecciosa y se normalizaron todas las muestras respecto a $5 \times 10^{12} \text{ UFC}^{\text{AMP}}/\text{ml}$. La medición de la fluorescencia se llevó a cabo en el instrumento Varioskan LUX a 488 exc./571 em.

Figura 11: evaluación del clon pVIII-mNGF03 en el contexto del sistema de fusión pHx-pIX. (A) Se extrajeron células durante el proceso de empaquetamiento. Se midió la fluorescencia de los cultivos iniciales (que contenían glucosa) para establecer el nivel basal para la medición de fluorescencia (Glu). Se midió la fluorescencia de las mismas células después del empaquetamiento durante la noche (ausencia de glucosa). Todas las muestras se normalizaron basándose en la densidad óptica, a un valor de A_{600} de 1. Se preparó una dilución en serie en pasos de 1:2. (B) Se determinó la concentración de fagos basándose en la cantidad de ADN presente en la muestra. Los datos en bruto se ajustaron al valor más bajo, $4,18 \times 10^{12}$.

La figura 12 muestra la tinción de fluorofagos de células SKW-3 R12-C9 mediante citometría de flujo. Se utilizó en todos los casos una entrada normalizada de fagos de $5 \times 10^{12} \text{ ufc}/\text{ml}$ para 5×10^4 células. A) Tinción de células SKW-3 R12-C9 transfectadas. Los fagos unidos se detectaron con IgY anti-FD conjugado con APC. B) Tinción de células SKW-3 no transfectadas. Los fagos unidos se detectaron con IgY anti-FD conjugado con APC. C) Tinción de las células SKW-3 R12-C9. Los fagos unidos se detectaron mediante la fluorescencia intrínseca de los fagos. D) SE analizaron muestras normalizadas de fagos para intensidad de fluorescencia en el lector de placas Varioskan LUX y la intensidad se expresa en unidades arbitrarias.

La figura 13 muestra la evaluación del rendimiento de fluorofagos en ELISA y FLISA. A,B) Se añadió una serie de dilución de muestras normalizadas de fagos (los diferentes títulos utilizados en pNGF03, TAT alto se indican en el eje x) a pocillos recubiertos con 1 µg/ml de pHx-BSA o bloqueo de leche. Los fagos capturados se analizaron para la señal fluorescencia en el lector de placas Varioskan LUX. C) Se detectaron las mismas muestras con un mAb anti-M13 HRP y se revelaron con TMB soluble. D) Se analizaron muestras normalizadas de fagos (5×10^{12} UFC^{AMP}/ml) para la intensidad de fluorescencia en el lector de placas Varioskan LUX y se expresa la intensidad en unidades arbitrarias.

La figura 14 muestra la comparación entre los niveles de fluorescencia bacteriana. Se cultivaron células XL1-blue que contenían vectores de expresión para los genes AC y B de TAT además del fagémido mNGF03, durante 16 horas a 37 °C en ausencia de glucosa para permitir la expresión de la proteína de fusión. Se utilizaron células sin fagémidos como controles negativos. Las células se lavaron 3x veces en PBS. Se midió la densidad óptica de las células y todas las muestras se ajustaron basándose en la densidad óptica a un valor de A600 de 1. Se preparó una dilución en serie en pasos de 1:2. La medición de la fluorescencia se llevó a cabo en el Varioskan LUX a 488 exc./517 em.

Ejemplo 1. Exposición de M13 eficiente de un fluoróforo biológico funcional sobre la proteína de cápside principal pVIII mediante la utilización de direccionamiento periplásmico.

Materiales y métodos.

Construcción del fagémido de exposición dual.

Todos los constructos de fluoróforo-pVIII se ensamblaron *in silico* y se adquirieron de Genscript (China). Los fragmentos se insertaron en el sitio de clonación NheI en el fagémido pGALD9ΔLFN (Løset, G.Å. et al., 2011, PLoS ONE, 6, e17433, los detalles del vector también se encuentran en Genbank HQ528250) que porta scFv GB113 (Nilssen et al., 2012, Nucleic Acids Research, 40, e120). Se confirmó el procedimiento de clonación mediante secuenciación (GATC, Alemania).

Se adquirió de Genscript un fragmento génico que contenía la etiqueta FLAG y la parte N-terminal de mNeonGreen y se insertó en los sitios de restricción SnaBI y BsgI con el fin de crear FLAG-mNeonGreen. La estructura general de este fagémido se muestra en el esquema de la figura 2A. Parte de esta secuencia de vector se muestra en la figura 9. Se prepararon fagémidos que contenían los fluoróforos mCherry y mGFPmut2 de una manera análoga.

Producción de fagos.

Se inocularon cinco ml de medio 2xYT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 20 µg/ml de tetraciclina y 0,1 de glucosa (YT-TAG) con células de una solución madre en glicerol de *E. coli* XL1-Blue que contenía el fagémido respectivo, y se cultivaron durante la noche a 37 °C en un agitador orbital. Se inocularon 200 ml de YT-TAG con el precultivo a una DO₆₀₀ de 0,025 y se cultivaron a 37 °C bajo agitación. Los cultivos se infectaron con MOI10 del fago ayudante DeltaPhage (Nilssen et al., 2012, supra), que es un fago ayudante con una inactivación condicional de su pIX cognado, permitiendo la exposición de alta valencia de pIX-PDI, a una DO₆₀₀ de 0,3 a 0,4. Tras 60 min de incubación, los cultivos se peletizaron y se resuspendieron en 2xYT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina, y se continuó la agitación a 28 °C durante 16 h. Se separaron las células bacterianas mediante centrifugación y filtración a través de filtros de 0,2 µm con succión de vacío (Millipore) y se mezclaron 1:5 con solución de polietilenglicol (PEG)/NaCl (PEG 8000 al 20 %, NaCl 2,5 M). Tras la incubación durante la noche sobre hielo, se centrifugó la muestra (5000xg, 45 min, 4 °C) y los pellets se disolvieron en 25 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Las muestras se mezclaron 1:5 con PEG/NaCl y se incubaron durante 4 h sobre hielo, seguido de centrifugación tal como anteriormente, y se resuspendieron los pellets en 1 ml de PBS. Se evaluaron los títulos de viriones mediante titulación de puntos infecciosos tal como se describe en Koch J. et al., 2000, Biotechniques, 29, 1196-1198, 2002.

Mediciones de fluorescencia.

Se determinaron los espectros de excitación/emisión utilizando un espectrofluorómetro FP-8500 (Jasco). Para equilibrar las interferencias con la sensibilidad del instrumento, los presentes inventores fijaron la separación entre excitación y emisión en 15 nm, permitiendo que el filtro de emisión aceptase $\pm 2,5$ nm de variación. Las mediciones se realizaron con intervalos de 5 nm tanto para la excitación como para la emisión.

Medición de fluorescencia de bacterias.

Se inocularon colonias individuales de *E. coli* que albergaba fagémidos fluorofago mNeonGreen o fluorofago mNeonGreen-FLAG en 5 ml de 2xYT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las células se peletizaron y se resuspendieron en 1xPBS, seguido de la normalización respecto a la DO₆₀₀ nm. Se prepararon las muestras en una serie de dilución 1:2 y se midió la fluorescencia con el lector de placas

multimodo Varioskan (Thermo Fischer) con la configuración de exc./em. apropiada para mNeonGreen dentro de las limitaciones del instrumento (500/525).

Microscopía confocal de bacterias sobre portaobjetos de vidrio.

Se inocularon colonias individuales de *E. coli* que albergaban las tres variantes de fagémidos fluorofagos: mNeonGreen, mGFPmut2 y mCherry en 5 ml de 2xYT suplementados con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 37 °C. Se pipetearon 3 µl de cultivos bacterianos sobre portaobjetos de vidrio y se aplicaron sobre los mismos cubreobjetos de vidrio. Las bacterias se visualizaron utilizando un microscopio confocal de escaneo laser FV1000 (Olympus) con longitudes de onda de láser disponibles apropiadas para cada fluoróforo ((488 nm: mNeonGreen y mGFPmut2, 543 nm: mCherry).

Medición de fluorescencia de fagos.

Se llevaron a cabo mediciones de intensidad de fluorescencia de fagos mediante normalización de las muestras de fagos (diluidas en 1xPBS) y medición de la fluorescencia con lector multimarcajes Victor³ (PerkinElmer) con filtro FITC (488/510) con 1 s de excitación o con el lector de placas multimodo Varioskan (Thermo Fischer) con la configuración de exc./em. apropiada para mNeonGreen dentro de las limitaciones del instrumento (500/525).

Las placas de microtitulación se recubrieron con 1 µg/ml de pHx-BSA durante la noche a 4 °C y se bloquearon con PBS con Tween (X) al 0,1 % y leche desnatada en polvo al 4 % (PBSTM). Se añadieron por triplicado diluciones en serie 1:4 de muestras de fagos partiendo de $2,5 \times 10^{12}$ ufc/ml diluidos en PBSTM. Los fagos unidos se detectaron con anti-m13 HRP (Amersham Biosciences) seguido de revelado con solución de TMB y lectura de la absorbancia a 610 nm, o mediante medición de la fluorescencia en el lector multimarcaje Victor³.

Citometría de flujo.

Se distribuyeron alícuotas de 2×10^5 células transfectantes BW 4B2A1 TCR y células BW no transfectantes (control negativo) en una placa de 96 pocillos en forma de V (NUNC). Se ajustaron los volúmenes totales a 250 µl/pocillo con FVS al 5 % p/v/PBS (pH 7,4). La placa se centrifugó a 300 g/5 min a TA y se descartaron los sobrenadantes. Se añadieron alícuotas de 50 µl/pocillo de fagos con títulos normalizados de 5×10^{11} ufc^{amp^R}/ml prebloqueados en FCS al 5 %/PBS (los pocillos de control recibieron FCS al 5 %/PBS únicamente) y la placa se incubó durante 1 h a 4 °C. Las células se lavaron mediante la adición de 200 µl/pocillo con FCS al 5 %/PBS; las células se peletizaron mediante centrifugación a 300 g/5 min/TA y se descartaron los sobrenadantes. Se añadió anti-fd de pollo conjugado con PE (Norwegian Antibodies) en FCS al 5 %/PBS, seguido de una incubación de 30 min a 4 °C. Los pocillos se lavaron tal como anteriormente y se fijaron con 200 µl/pocillo de PFA al 2 % y se mantuvieron en la oscuridad hasta el análisis en un FACScalibur (BD Biosciences). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software FlowJo (v10.2).

Resultados y discusión.

Construcción.

Se diseñaron varios fagémidos variantes basándose en el vector fagémido pGALD9ΔLFN (Løset G.Å. et al., 2011, supra) (ver las figuras 1 y 2). En el caso de los fagémidos de exposición dual ilustrados en la figura 2, dichos fagémidos codifican una proteína de interés (PDI) (en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo, scFv, del anticuerpo GB113) fusionado con pIX. Se seleccionó este sistema debido a que se ha encontrado previamente que la exposición en pIX funciona muy favorablemente en, p. ej., la selección con anticuerpos ((Hoydahl et al., 2016, Scientific Reports, 6, 39066; Løset G.Å. et al., 2011, PLoS One, 6, e14702). El fagémido codifica, además, la chaperona periplásmica FkpA para una eficiencia de plegamiento mejorada (Gunnarsen et al., 2010, BMC Biotechnol., 10, 8). Con el fin de exponer una proteína de direccionamiento y un fluoróforo en dos proteínas de cubierta diferentes de manera simultánea, se insertó la fusión de pVIII directamente después de la terminación de pIX en el fagémido. Ello permite que el nuevo ORF sea regulado por el mismo promotor (lac), permitiendo de esta manera la producción de partículas fágicas de exposición dual con fusiones con tanto pIX como pVIII (figuras 2A y 2B).

Se incluyeron algunas variaciones en los constructos (tal como se muestra en la figura 2A). Para investigar el efecto de las variaciones en la intensidad de traducción, los presentes inventores incluyeron una SD débil (que comprendía la secuencia AGGAGA, con la región cadena arriba del sitio de inicio ATG del péptido de señal Tat que presenta la secuencia AAGGAGACAGTCATA) o una SD fuerte (se utilizó la TIR T7g10, que también incluye una secuencia épsilon, TTAACCTTA, con la región cadena arriba del sitio de inicio ATG del péptido de señal Tat que presenta la secuencia TTAACCTTAAGAAGGAGATATACAT). Una traducción más fuerte podría forzar una mayor cantidad de fusiones de pVIII en la partícula en crecimiento. Con el fin de investigar la importancia de las rutas de traslocación, los presentes inventores introdujeron gp8ss o TorAB7 como péptidos líder de direccionamiento periplásmico. El péptido líder gp8ss proporciona el direccionamiento de la fusión a la ruta Sec del sistema secretorio, a través del cual la proteína se trasloca en un estado no plegado y permite que ocurra el plegamiento en el medio oxidante del periplasma (Manting, E.H. y Driessen, A.J., 2000, Mol. Microbiol., 37, 226-238). El péptido líder TorAB7 ha sido manipulado para un direccionamiento periplásmico mejorado de GFP (DeLisa et al., 2002, supra) y presenta como diana la fusión con

la ruta Twin Arginine Transport (TAT), donde la proteína se pliega bajo las condiciones reductoras del citoplasma previamente a la traslocación. La proteína totalmente plegada seguidamente es traslocada al periplasma (Berks, B.C. et al., 2005, Curr. Opin. Microbiol., 8, 174-181).

Con el fin de investigar cómo funcionan diversas proteínas fluorescentes como fusiones con pVIII, se evaluaron tres proteínas fluorescentes diferentes: GFPmut2 (Cormack, B.P. et al., 1996, Gene, 173, 33-38), que es una versión optimizada para FACS de GFP que se seleccionó por un desplazamiento al rojo para la detección óptima en la selección de FACS utilizando un filtro FITC estándar a partir de una biblioteca de *E. coli*. La GFP mutante también demostró ser un plegador excelente al expresarse en *E. coli*. Se seleccionó otra proteína fluorescente verde, mNeonGreen (Shaner, N.C. et al., 2013, Nat. Methods, 10, 407-409). Los presentes inventores seleccionaron, además, mCherry (Shaner, N.C. et al., 2004, Nat. Biotechnol., 22, 1567-1572) basándose en los resultados de un estudio anterior realizado con la exposición de fluoróforos biológicos (Speck et al., 2011, supra), en donde se mostró que se exponía funcionalmente independientemente de la ruta de traslocación. A menos que se especifique lo contrario, la fusión de pIX era scFv GB113, un fragmento de anticuerpo que reacciona exclusivamente con el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) murino 4B2A1 (Bogen, B. et al., 1990, Eur. J. Immunol., 20, 2359-2362), y se ha mostrado previamente que funciona bien en la citometría de flujo al exponerlo sobre fagos (Nilssen, N.R. et al., 2012, Nucleic Acids Research, 40, e120).

Producción de fagos y validación.

Con el fin de confirmar que la fusión de pVIII-fluoróforo en efecto producía proteínas fluorescentes, los presentes inventores inspeccionaron cultivos de células *E. coli* transformadas utilizando microscopía de fluorescencia. En preparación para ello, los presentes inventores encontraron que las bacterias transformadas con un fagémido que albergaba la combinación de una SD fuerte y proteína fluorescente con diana en SEC no crecía en cultivo al eliminar el represor glucosa, y de esta manera, se omitió esta versión de fagémido de los experimentos posteriores (datos no mostrados).

Las variantes de fagémido con los fluoróforos mNeonGreen, mCherry y mGFPmut2 (figura 2A) se transformaron en *E. coli*, que seguidamente se cultivaron durante la noche a 30 °C para permitir la expresión de los fluoróforos. Todos estos fagémidos variantes contenían una secuencia SD débil y una secuencia de señal TorAB7. Se añadieron los cultivos celulares a portaobjetos de vidrio y se visualizó la fluorescencia utilizando un microscopio confocal. Los resultados se muestran en la figura 3, en la que puede observarse que mNeonGreen y mGFPmut2 muestran una fluorescencia clara y brillante, y que mCherry muestra una fluorescencia débil. La presencia de niveles detectables de fluorescencia con la totalidad de los tres fluoróforos demuestra que los fluoróforos se expresan y están plegados correctamente. Esta expresión de fluoróforos se confirmó mediante transferencia western (datos no mostrados). De esta manera, el sistema de fagémido anteriormente descrito funciona para exponer proteínas de fusión de fluoróforo-pVIII funcionales.

Debido a que mNeonGreen y mGFPmut2 mostraron una fluorescencia detectable mejor que mCherry, se llevaron a cabo experimentos adicionales con estos constructos.

Con el fin de evaluar si la adición de una fusión de una segunda proteína de cubierta al sistema afectaría a la producción de fagos y/o al empaquetamiento de fagémidos, los presentes inventores produjeron la totalidad de las variantes de fluorofago portadores de proteínas fluorescentes verdes (mGFPmut2 y mNeonGreen) y midieron la producción de fagos y el empaquetamiento de fagémidos mediante titulación infecciosa (figura 4A). Todas las muestras de fagos alcanzaron títulos finales comparables a los observados previamente en el sistema de pIX de los presentes inventores (Loset et al., 2011, e17433, supra, y Nilssen et al., 2012, supra). Además, tal como se ha observado previamente, el rescate de fagémidos con DeltaPhage, un fago ayudante con una inactivación condicional de su pIX cognado, que permite una exposición de alta valencia de pIX-PDI, aparentemente no afectó a la producción de fagos (Nilssen et al., 2012, supra). La combinación de SD débil y direccionamiento de SEC causó un empaquetamiento preferente del genoma de fago ayudante para mNeonGreen y se observó el mismo efecto para SD fuerte y direccionamiento de TAT para mGFPmut2 (figura 4B). Sin embargo, estos resultados muestran que los fagémidos de exposición dual que contienen fusiones de dos proteínas de cubierta son empaquetados y permiten la producción de fagos a niveles equivalentes a los observados cuando solo está presente una fusión de pIX.

Con el fin de evaluar los niveles de proteínas fluorescentes funcionales presentadas sobre las partículas de fluorofago, se analizaron muestras normalizadas de fluorofagos en el lector multimarcaje Victor³ utilizando un filtro FITC (488 nm/510 nm) (figura 4C). La combinación de SD débil y mNeonGreen direccionado a TAT destacó ya que excedía la fluorescencia de fondo en como mínimo tres veces. Sin embargo, el fluorofago con una SD fuerte y direccionamiento a TAT también mostró una intensidad aproximadamente dos veces más alta que la de fondo, mientras que la intensidad de, por ejemplo, el fluorofago mGFPmut2 con una SD débil y direccionamiento a TAT fue ligeramente superior a la señal de fondo. Las variaciones en la valencia de la exposición de pIX PDI aparentemente no afectaron a los niveles de exposición funcional de la proteína fluorescente sobre pVIII. El alcanzar títulos finales elevados es muy importante para aplicaciones posteriores, tales como selecciones en bibliotecas, y los fluorofagos no se produjeron en un número inferior al observado previamente en el sistema pIX. El constructo fluorofago en efecto produjo partículas fágicas fluorescente, y una de las variaciones, mNeongreen direccionado a TAT con una SD débil alcanzó una relación de

señal a ruido satisfactoria. Cabe destacar que mNeonGreen posee un pico de excitación estrecho en 506 nm y análogamente un pico de emisión estrecho en 517 nm que no se corresponde con el filtro de fluoresceína utilizado en el Victor³ (485 nm/535 nm). La intensidad medida utilizando este filtro probablemente ha sido subestimada considerablemente. No obstante, la combinación de SD débil y mNeonGreen direccionado a TAT destacó como el constructo con mejor rendimiento y, de esta manera, fue seleccionado para la caracterización posterior.

Con el fin de investigar y verificar los espectros de excitación y emisión de mNeonGreen al exponerlo sobre pVIII, se analizaron 2×10^{11} partículas fágicas/ml en un espectrofluorímetro (datos no mostrados). Como control positivo los presentes inventores incluyeron 2 µg/ml de eGFP soluble, que mostró un pico claro y definido en las longitudes de onda esperadas (490 nm/510 nm). Como control negativo se analizaron partículas fágicas que exponían scFv GB113 pero no fluoróforo. En este caso se observó un pico estrecho en 440 nm/455 nm. Al analizar las muestras fágicas con exposición de mNeonGreen, apareció el mismo pico estrecho además del pico esperado de mNeonGreen correctamente plegado en (505 nm/520 nm) (Shaner et al., 2013, supra).

Optimización de la exposición funcional.

Los presentes inventores deseaban investigar si existían diferencias de expresión y plegamiento en las cepas de laboratorio estándares de *E. coli* y si alguna diferencia se traduciría en niveles de exposición funcional. Además, se deseaba incluir una etiqueta de detección para la expresión de proteínas fluorescentes, y se añadió una etiqueta FLAG al extremo N-terminal de mNeonGreen. Se transformaron cuatro cepas de *E. coli*: XL1-Blue, AVB100F', SS320 y Top10F', con el fluorofago ± FLAG.

A continuación, se midió directamente la intensidad de fluorescencia en células *E. coli* vivas (figura 5A). SE observó una clara diferencia de fluorescencia entre cepas. Las proteínas expresadas en XL1-blue proporcionaron la intensidad más alta, estrechamente seguidas de AVB100F'. Estas dos cepas mostraron una intensidad de fluorescencia marcadamente más alta que SS320 y TOP10F', aunque la expresión funcional y plegamiento todavía se observaba claramente en estas cepas. Inesperadamente, los presentes inventores observaron que la adición de FLAG aparentemente se traducía en intensidades de fluorescencia global más altas. Estos constructos que contenían FLAG seguidamente se utilizaron para medir la intensidad de fluorescencia de muestras de fagos producidas en las cuatro cepas individuales (figura 5B) y nuevamente compararon la fluorescencia de mNeonGreen-FLAG de fluorofagos empaquetados en las cuatro cepas diferentes (figura 5B), resultó claro que XL1-blue era la mejor cepa, seguido de AVB100F'. Los fagos empaquetados en SS320 y Top10F' proporcionaron intensidades de fluorescencia más bajas.

Aunque están estrechamente relacionadas, las diferentes cepas mostraron diferencias bastante grandes de expresión funcional y plegamiento de los fluoróforos. Además, aunque XL1-Blue y AVB100 fueron muy similares en la fluorescencia bacteriana al producir la fusión pVIII-fluoróforo por sí sola, las partículas de fluorofago producidas en XL1-blue proporcionaron una intensidad de fluorescencia prácticamente dos veces superior. Estos datos sugieren que la capacidad favorable de plegar el fluoróforo funcionalmente en el citosol es compartida por XL1-Blue y AVB100, lo que contrasta con SS320 y TOP10F'. Sin embargo, XL1-Blue aparentemente posee una capacidad superior también en comparación con AVB100 de transportar el fluoróforo plegado desde el citosol hasta el periplasma, y de integrarlo en el virión. De esta manera, aunque puede utilizarse cualquiera de estas cepas (o, en efecto, otras cepas de *E. coli*), XL1-Blue resulta preferente en algunos casos.

Ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) y ensayo de inmunosorción ligada a fluorescencia (FLISA).

Con el fin de evaluar si se podía combinar o no la capacidad de exponer tanto una fusión de fluoróforo-pVIII funcional como una fusión funcional diferente en una cápside diferente que pVIII en la misma partícula fágica, los presentes inventores decidieron insertar un scFv anti-phOx bien descrito (Marks et al., 1992, Biotechnology, 10:779-783) en el fagémido expresante de fluoróforo-pVIII en forma de una fusión de pIX. A continuación, se prepararon los fagos y se sometieron a ensayo para la unión de phox en un ELISA clásico, así como en un FLISA, tal como se ha descrito. Para la comparación, se prepararon fagos que exponían scFv anti-phox/pIX sin la fusión de fluoróforo-pVIII y se sometieron a ensayo en paralelo.

Se midió la intensidad de fluorescencia de cantidades normalizadas de partículas fágicas en el lector de placas Victor3 (figura 6A) y mostraron una intensidad de fluorescencia muy elevada, y solo de los fagos que exponían la fusión de fluoróforo-pVIII. Es importante que al someter a ensayo las mismas muestras de fagos para la unión a la diana de scFv en un ELISA estándar, se observó una unión específica e idéntica con independencia de la presencia o ausencia de la fusión de fluoróforo-pVIII (figura 6B). De esta manera, los datos demuestran que la exposición de un fluoróforo sobre pVIII no afectó a la unión de antígenos mediada por la fracción de direccionamiento en la fusión de pIX en los fagos de exposición dual. Al someter a ensayo nuevamente las mismas muestras de fagos para la unión a la diana utilizando FLISA con el lector de placas Victor3, no pudo observarse ninguna señal fluorescente de ninguna muestra (figura 6C). De esta manera, los datos muestran que la medición de la fluorescencia de todos los fagos aplicados en el pocillo se lleva a cabo fácilmente, mientras que en el diseño actual, los presentes inventores no dispusieron de sensibilidad para detectar específicamente la reducida cantidad de fagos retenidos sobre la diana tras el lavado en el FLISA. Es importante que los datos muestran inequívocamente que la exposición dual de la fusión de fluoróforo-pVIII y la fusión scFv-pIX en la misma partícula fágica no afecta al fenotipo de la fusión scFv-pIX.

Detección de proteínas expresadas en la superficie celular mediante citometría de flujo.

Una potente aplicación de los fluorofagos sería utilizarlos en la selección en tiempo real en FACS sin necesidad de anticuerpos de tinción, sino solo basándose en la fluorescencia inherente de la fusión de fluoróforo-pVIII para la detección. Para evaluarlo, los presentes inventores sometieron a ensayo el fluorofago que exponía scFv GB113-pIX para la unión específica al receptor de células T expresado sobre las células de hibridoma de células T 4B2A1 murinas mediante citometría de flujo. Para la comparación se prepararon fagos que exponían scFv GB113-pIX sin la fusión de fluoróforo-pVIII y se sometieron a ensayo en paralelo.

Con el fin de verificar la unión específica a las células que expresaban el TCR 4B2A1 utilizando metodología estándar, los presentes inventores utilizaron un anticuerpo anti-fd conjugado con PE para detectar los fagos unidos. Ello también permitió una comparación lado a lado del fluorofago y el fago regular unido al TCR (figura 7A), y ninguno se unía a las células BW58 murinas negativas para TCR (PMID: 2558022) (figura 7B). Al intentar teñir las células sin la adición de un mAAb de detección, los presentes inventores no observaron ningún incremento de la intensidad de fluorescencia en comparación con los controles (figura 7C), a pesar de la fuerte señal de fluorescencia observada de fluorofago scFv GB113 cuando estaba en solución (figura 7D). De esta manera, aunque el fluorofago mostraba una señal fluorescente fuerte en solución, no pudieron detectarlo en la unión a antígeno unido en superficie mediante citometría de flujo. Ello significa que, aunque este fluorofago es altamente útil y ventajoso en muchos ensayos, el fluorofago en esta forma todavía no alcanza el brillo por partícula necesario para permitir la tinción directa y la separación por FACS de las células.

Conclusiones finales.

Se ha informado de los esfuerzos anteriores que han intentado aprovechar las ventajas combinadas de las tecnologías de fagos y células, aunque todavía no se ha llegado a su utilización habitual. La exposición funcional de proteínas fluorescentes sobre partículas fágicas ya se ha conseguido previamente, pero hasta el momento solo ha tenido un éxito limitado y no se ha conseguido con la proteína de cubierta pVIII. En este punto, el acoplamiento indirecto *in vitro* de un fluoróforo con pVIII etiquetada con sortasa ha mostrado el mayor potencial (Hess et al., 2012, *supra*), aunque este procedimiento es ineficiente, laborioso y caro.

En la presente memoria se muestra la generación de una partícula fágica con tanto capacidad de fluorescencia intrínseca como actividad de unión a la diana. mNeonGreen demostró ser el mejor fluoróforo de los investigados para exposición sobre pVIII. Los presentes inventores encontraron que las condiciones óptimas para la exposición funcional de fluoróforos biológicos sobre pVIII implicaba la traslocación de la fusión por la ruta Tat para el plegamiento en el citosol. Inesperadamente también se encontró que una SD débil proporcionaba la exposición funcional más alta. La causa exacta de ello es desconocida, aunque podría conjeturarse que puede producirse una especie de sobrecarga de la maquinaria de plegamiento de *E. coli*. Se mostró que XL1-Blue proporcionaba la intensidad de fluorescencia más alta a las partículas fágicas producidas.

El posible uso final de dicho reactivo no está limitado a la selección y cribado de los anticuerpos. Cualquier proteína que pueda exponerse sobre un fago puede insertarse en un fagémido fluorofago para producir un reactivo de detección de una sola capa.

Aunque el fluorofago mostraba una fluorescencia fuerte y presentará una utilidad ventajosa en muchos ensayos debido a su fluorescencia intrínseca, evitando de esta manera la utilización de reactivos/anticuerpos marcados o de tinción, combinado con su capacidad de unión a una molécula diana mediante la fusión de segunda proteína de cubierta a una PDI, todavía no era suficientemente brillante para detectarlo al unirse al antígeno. Una posible manera de conseguirlo podría ser incrementar el brillo de las partículas de fluorofago. Lo anterior teóricamente podría conseguirse mediante: 1) el incremento del número de pVIII-mNeonGreen por partícula, o 2) la mejora de la exposición funcional de mNeonGreen mediante la mejora del plegamiento, o 3) el incremento del brillo intrínseco de mNeonGreen, o una combinación de todos.

Con este fin, los presentes inventores ventajosamente han podido desarrollar variantes de los constructos de fluorofago que muestran una eficacia mejorada (propiedades de fluorescencia mejorada).

Ejemplo 2: generación de fluorofagos variantes.

La mutación aleatoria de aminoácidos en la secuencia de la proteína mNeonGreen original (parental) tal como se describe en la presente memoria (SEC ID n.º 3 y n.º 4) se llevó a cabo para evaluar si era posible producir una versión que sea más brillante que la proteína (parental) existente o muestra una exposición mejorada en forma de una fusión de pVIII en la cubierta fágica. Idealmente, los presentes inventores pudieron identificar un mutante que mostraba una mejora en ambas categorías. Sin embargo, los presentes inventores no estaban seguros de que ello fuera posible.

Los presentes inventores construyeron una biblioteca que consistía en variantes de vector fluorofago portadores de mutaciones en el gen de mNeonGreen, el conector y los primeros 90 nucleótidos del gen de pVIII.

La parte del constructo que se sometió a mutagénesis se muestra a continuación (estas tres partes se encuentran como secuencias consecutivas en el vector, pero se ha mostrado por separado en la presente memoria por claridad):

```

GTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGGCCGGCTACCCAGG
AACTGCACATCTTTCGGTTCATCAACGGTGTGACTTCGACATGGGTTGTCAGGGTACCGGTAAACCGAAGGACGGTT
ACGAAGRACTGAACCTGAAATCTACCAAAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGAACTTAGTTCCGCACATCGGTTACG
GTTTCCACACAGTACCGCGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGGTCCAGGCTGCTAGGTTGACCGGTTCTGCTTACGAGG
TTCAACGGTACCATGCAGTTCCAAGACGGTGGTTCTCTGACCGTTAACTACCGTTACACCTACGAAGGTTCTGCACATCA
AAGGTGAAGCTCAGGTTAAAGGTACCGGTTTCCCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTGTGACCGCTGCTGACT
GGTGGCGTTCTAAAAAAACCTACCCGAACGACAAAAACCATCATCTCTACCTTCAAAATGGTCTTACACCAACCGGTAACG
GTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACACCACTACCTTCCGTTAAACCGATGGCTGCTAACTACCTGAAAAACGAGC
CGATCTACGTTTTCCGTAAAAACCGAAGCTGAACACTCTAAACCGAAGTGAACCTCAAGAAGTGGCAGAAAGCTTTCA
CCGACGTTATGGGTATGGACGAAGTGTACAAA (mNeonGreen)
GGCGGTGGCAGCGCGCGGTGGCAGC (conector)
GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCCTTTAACTCCC

```

5

TCGAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGCGGATGCTTGT pVIII (parcialmente, primeros 90
nucleótidos), (SEC ID n.º 56)

Construcción de bibliotecas.

10

Los presentes inventores llevaron a cabo la incorporación de análogos de dNTP mediante PCR para introducir mutaciones aleatorias en el ADN de fagémido. Basándose en el artículo de Zacco et al. (1996, J. Mol. Biol. 255(4):589-603), Jena Biosciences produce y comercializa un kit de mutagénesis basado en PCR que se utilizó durante la generación de bibliotecas. Como herramienta de clonación se utilizó el kit de clonación de ensamblaje de ADN de alta fidelidad NEBuilder®. Este kit liga cualesquiera fragmentos con solapamientos de secuencias de entre 15 y 80 nucleótidos.

15

Mutagénesis:

20

Los presentes inventores crearon y caracterizaron bibliotecas de un fragmento con diferentes cargas mutacionales basadas en el número de rondas/ciclos utilizados para incorporar análogos de dNTP durante la PCR. Se seleccionó un fragmento que contenía el gen de la fusión de pVIII de fluorofago completo (incluyendo la totalidad de los 5 dominios funcionales, es decir, TorAB7, FLAG, mNG, conector y pVIII de longitud completa) y sus regiones flanqueantes (ver las secuencias posteriormente). Utilizando este enfoque, los presentes inventores tienen la posibilidad de volver y amplificar diferentes regiones para construir nuevas bibliotecas en el futuro sin necesidad de pasar nuevamente por el proceso de mutagénesis: las partes individuales de dicho constructo se muestran a continuación (estas partes se encuentran en forma de secuencias consecutivas en el vector, pero se han mostrado separadas en la presente memoria por claridad):

25

AGTGTTTTAGTGATTTCTTTTCGCCCTCTTTCGTTTTAGGTTGGTGCCTTCGTAGTGGCATTACGTATTTTACCCGTTTA

AT

GGAAACTTCCCTCATGATAAGCTAGCAAGCAAGGAGACAGTCATA (región flanqueante)

ATGAACAATAACGATCTCTTTTCAGACATCACGTACG

CGTTTTTTGGCACAACTCGGCGGCTTAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAACGCCCGACGTGGGACT

(Tor AB7)

GCGGCG (aminoácidos AA)

Gattacaaggatgacgatgacaag (FLAG)

GGC (aminoácido G)

GTTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCTCTGCCGGCTACCCACG

AACTGCACATCTTCGGTCTATCAACGGTGTGACTTCGACATGGTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTT

ACGAAGAAGTGAACCTGAAATCTACCAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCCGCACATCGGTTACG

GTTTCCACCACTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGGTTGACGGTTCTGGTTACACAGG

TTCCACCGTACCATGCAGTTTGAAGACGGTGTCTCTGACCGTTAACTACCGTTACACCTACGAAGGTCTCTACATCA

AAGGTGAAGCTCAGGTTAAAGGTACCGGTTTCCCGGCTGACCGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACT

GGTGCCGTTCTAAAAAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTTACACCAACCGGTAACG

GTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTAAACCGATGGCTGCTAACTACCTGAAAAACGAGC

CGATGTACGTTTCCGTAACCGAACTGAAACACTCTAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTCA

CCGACGTTATGGGTATGGACGAAGTGTACAAA (mNeonGreen)

GGCGGTGGCAGCGGCGGTGGCAGC (Conector)

GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCC

TGCAAGCCTCAGCGACCGAATAATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTGGCGCAACTATCGGTATCA

AG

CTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGC (pVIII completa)

TGATAA

GCTAGCTTGAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGAC

TGGGCCCTTTCATTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTTAACGCTTGTCGTCATGCTCCTTGTAGTCTTTTTTAGCAGAATCTG

CG

GCTTTCGCATCAGCTTCGGGCTTTCATCAGC (región flanqueante), (SEC ID n.º 57)

Esta secuencia se produjo con los cebadores siguientes:

pVIII_fwd: AGTGTTTTAGTGATTTCTTTTCGCC (SEC ID n.º 58)

FkpA_R: GCTGATGCAAAGCCGG (SEC ID n.º 59)

- 5 Las secuencias se analizaron utilizando el servicio de secuenciación de Sanger de GATC (Alemania). Se llevaron a cabo hasta 28 rondas (ciclos de PCR) que resultó en una frecuencia de mutación de aproximadamente 25 % al nivel de los aminoácidos (aproximadamente 10 % al nivel de los nucleótidos), datos no mostrados.

- 10 Los fragmentos mutagenizados se clonaron nuevamente en el vector, tal como se muestra en la figura 2, que comprende un péptido de señal TorAB7 y una etiqueta FLAG. Las secuencias de los componentes TorAB7, FLAG, mNG, conector y pVIII de dicho vector son las mostradas en la figura 9.

Clonación de la biblioteca:

El proceso de clonación es sencillo y los presentes inventores siguieron las recomendaciones del kit de clonación de ensamblaje de ADN de alta fidelidad NEBuilder®.

- 15 La reacción de ligación completa se transformó en SS320 electrocompetentes para producir una biblioteca de alta diversidad. El cálculo basado en la titulación de la biblioteca fue de 10⁶. A continuación, los presentes inventores

prepararon ADN a partir de las células SS320 y células XL1-blue electroporadas, la cepa de empaquetamiento estándar para los fluorofagos.

5 La biblioteca se empaquetó con Hyperphage siguiendo los protocolos de empaquetamiento estándares y los miembros de la biblioteca de mutantes se cribó mediante FACS.

Estrategia de agrupamiento en FACS ARIA II.

10 En la figura 8 se muestra una vista general de la estrategia de clasificación completa. Los presentes inventores seleccionaron los grupos de clasificación de la biblioteca basándose en dos características: rendimiento de mNeonGreen (verde; Alexa488) y el nivel de exposición de proteína de fusión (roja; APC). (Para la segunda característica, el nivel de proteína de fusión de mNeonGreen-pVIII unido a la superficie puede cuantificarse utilizando un anticuerpo conjugado anti-DYKDDDDK-APC, es decir, un anticuerpo antietiqueta FLAG marcado fluorescentemente). La estrategia de selección en la primera ronda era liberal con respecto a la fuerza de la señal de ambos canales. Las células clasificadas se empaquetaron para producir la biblioteca fágica correspondiente. A 15 continuación, se utilizó un inmunotubo recubierto con anti-FLAG®-M2 para enriquecer los clones en proteínas de fusión integradas en la cubierta fágica. Se transdujeron células XL1-blue nuevas con la producción de dicho enriquecimiento y las células resultantes se prepararon para la clasificación tal como en la ronda 1. El agrupamiento en la ronda 2 fue mucho más restrictivo y pretendía clasificar únicamente los clones doblemente positivos.

20 Puede observarse a partir de los perfiles de FACS mostrados en la figura 8 que se han generado miembros de la biblioteca con un número incrementado de fluoróforos sobre la superficie y/o los clones con una señal de mNeonGreen incrementada. Ver el desplazamiento de clones desde el cuadrante izquierdo inferior del panel de FACS en el lado izquierdo de la figura 8 (que muestra los resultados antes de la clasificación), al cuadrante derecho inferior (niveles elevados de FLAG en superficie, señal de APC), el cuadrante izquierdo superior (señal incrementada de mNeonGreen) o el cuadrante derecho superior (clones con niveles elevados de FLAG en superficie, señal de APC y señal incrementada de mNeonGreen) observado en los perfiles de FACS de ronda 2 de la figura 8 (es decir, después de 25 dos rondas de clasificación).

30 Dichos resultados muestran que pueden conseguirse fluorofagos variantes que han incrementado y mejorado significativamente la fluorescencia respecto a la observada al utilizar la secuencia de mNeonGreen parental, y ahora pueden caracterizarse adicionalmente clones individuales con el fin de seleccionar los mutantes altamente ventajosos.

Ejemplo 3: caracterización de un fluoróforo mutante.

35 Las bibliotecas preparadas tal como se ha descrito anteriormente pueden cribarse para mutantes que muestran propiedades de fluorescencia mejoradas. Uno de los clones mejorados identificados mediante dichos cribados es el denominado mutante F03 tal como se describe en la presente memoria. Este mutante F03 se identificó a partir de uno de los cribados que contenía bibliotecas con mutaciones en la pVIII de longitud completa. Al secuenciar la parte pVIII del mutante F03, presentaba la secuencia de nucleótidos siguiente:

```
GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAA
GCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGG
GCGATG
GTTGTTGTGATTATAGGCGCCACTATCGGTATCAAGCTGTTAAGAAATTCACCTC
GAAAGCAAGC (SEC ID n.º 60)
```

La secuencia de aminoácidos era:

45 AEGDDP AKAAFNSLQASATEYIGYAW AMVVVIIGAT IGIKLFKKFT SKAS
(SEC ID n.º 61)

50 El clon F03 contenía únicamente una sola mutación de aminoácido en la proteína de fusión de mNeonGreen-pVIII en comparación con el clon parental, que era una mutación de V a I en la posición 33 de la proteína pVIII. El codón correspondiente era GTC en el clon parental, que era ATA en el clon F03.

55 Las células XL1-blue que contenían los diferentes fagémicos (ya sea la proteína de fusión de mNG-pVIII de tipo salvaje/parental en el contexto del sistema de fusión de GB113 descrito anteriormente, es decir, mNGwt, o el clon F03 con la secuencia de pVIII con mNG mutado, mNGF03) se cultivaron durante 16 horas a 37 °C en ausencia de glucosa para permitir la expresión de la proteína de fusión. Las células se lavaron 3 veces en PBS. Se midió la densidad óptica de las células y se ajustaron todas las muestras basándose en la densidad óptica, a un valor A600 de 1. Se preparó una dilución en serie en pasos de 1:2.

Los resultados se muestran en la figura 10. El panel 10A muestra la comparación entre la intensidad de fluorescencia medida directamente en células XL-1 blue vivas que expresan el fluorofago original (mNGwt) con el candidato líder del cribado (mNGF03). El panel 10B muestra la misma comparación mediante la monitorización de la intensidad de fluorescencia de las partículas fágicas que han sido empaquetadas en las cepas siguiendo el protocolo estándar utilizando DeltaPhage tal como se ha descrito anteriormente. Se determinaron las concentraciones de las muestras mediante titulación infecciosa y todas las muestras se normalizaron a 5×10^{12} UFC^{AMP}/ml. Se llevó a cabo una medición de la fluorescencia en el instrumento Varioskan LUX a 488 exc./517 em.

Puede observarse que el clon F03 muestra una fluorescencia bacteriana y de las partículas fágicas incrementada que es aproximadamente 2 veces más alta que la fluorescencia observada con el clon parental.

El casete de fusión mNGF03-pVIII se clonó en el sistema de fusión phOx-pIX tal como se ha descrito anteriormente, para formar un constructo de expresión dual. Las células bacterianas que expresaban tanto phOx-mNGwt tal como se ha descrito anteriormente como phOx-mNGF03 se evaluaron para intensidad de fluorescencia (figura 11A), al igual que las partículas fágicas (figura 11B).

En la figura 11A, se extrajeron células durante el proceso de empaquetamiento. Se midió la fluorescencia a partir de los cultivos iniciales (que contenían glucosa) a fin de establecer el nivel basal para la medición de la fluorescencia (Glu). Se midió la fluorescencia de las mismas células después del empaquetamiento durante la noche (ausencia de glucosa). Todas las muestras se normalizaron basándose en la densidad óptica, a un valor de A600 de 1. Se preparó una dilución en serie en pasos de 1:2. En la figura 11B, se determinó la concentración de fagos basándose en la cantidad de ADN presente en la muestra. Los datos en bruto se ajustaron al valor más bajo, $4,1 \times 10^{12}$.

Puede observarse a partir de las figuras 11A y B que en el sistema phOX, mNGwt produce un buen nivel de fluorescencia según medición tanto en células bacterianas (figura 11A) como en partículas fágicas (figura 11B). Las figuras 11A y B muestran que mNGF03 también produce fluorescencia en el sistema phOx. La figura 11B también muestra que, una vez ajustado para el título, el fago phOx-mNGF03 muestra una mejor señal de fluorescencia por fago que mNGwt.

Se construyó un vector adicional de exposición dual en el que se había fusionado scFv anti-TCR de ratón H57 con pIX.

Construcción de pGALD9FN.

Se generó la secuencia de anticuerpo H57 scFv anti-TCR de ratón tal como han descrito Huppa et al., 2010 (Nature 463:967-3) fusionada con pIV, mediante síntesis génica (SG) y clonación molecular estándar en el fagémido pGALD9 Δ LFN en los sitios de ER NcoI/NotI compatibles (Huppa et al. 2010, *supra*; Løset et al. 2011, PLoS ONE, 6: e17433, *supra*). La SG, el procedimiento de clonación y la confirmación mediante secuenciación fueron llevadas a cabo por Eurofins.

Construcción de H57-mNGF03.

El casete que contenía el casete completo mNGF03-pVIII se subclonó en el fagémido pGALD9 Δ LFN-H57 utilizando el NheI flanqueante. Se confirmó la orientación correcta mediante secuenciación, realizada por Eurofins.

Construcción de vector retroviral para la expresión de TCR.

Se clonó un gen que contenía V α y V β del TCR R12-C9 (Straetemans, T. et al., 2012) injertado en C α y C β murinos, respectivamente, con alfa y beta acoplados mediante el péptido escindible P2A (Eurofins Genomics), en pMSCV-Neo (Clontech) con un MCS reorganizado en los sitios de restricción EcoRI y XhoI esencialmente tal como se ha descrito (Holst, J. et al., Generation of T-cell receptor retrogenic mice. Nat. Protocols 1, 406-417, 2006).

Construcción de la línea celular SKW-3 R12-C9.

Se cotransfectaron células GP2-293 (Clontech) con pMSCV-Neo R12-C9 y pEco (Clontech). El sobrenadante vírico se transdujo en células SKW-3 (CLS Cell Line Services, Alemania). Un pool transducido de células SKW-3 R12-C9 se cotifó con el mAb α -hCD3 PE (BD Biosciences) y mAb H57-A64 específico de mC β (LifeTech) y se aislaron los transductantes positivos en un instrumento FACS Aria IIu (BD).

Citometría de flujo.

Se distribuyeron alícuotas de 5×10^4 células transfectantes SKW-3 R12-C9 TCR y células SKW-3 no transfectadas (control negativo) en una placa de 96 pocillos en forma de V (Costar). Se ajustaron los volúmenes totales a 250 μ l/pocillo con BSA al 0,5 % p/v/PBS (pH 7,4). La placa se centrifugó a 300g/5 min a TA y se descartaron los sobrenadantes. Se añadieron alícuotas de 25 μ l/pocillo de fagos con títulos normalizados de 5×10^{12} ufc^{ampR}/ml

prebloqueados en BSA al 0,5 %/PBS (los pocillos de control recibieron solo BSA al 0,5 %/PBS) y la placa se incubó durante 30 min a TA. Las células se lavaron mediante la adición de 200 µl/pocillo con BSA al 0,5 %/PBS; las células se peletizaron mediante centrifugación a 300 g/5 min/TA y se descartaron los sobrenadantes. Se añadieron anticuerpos anti-fd de pollo conjugados con APC (Norwegian Antibodies) en BSA al 0,5 %/PBS a los pocillos apropiados, seguido de una incubación de 30 min a 4 °C. Los pocillos se lavaron dos veces tal como anteriormente y se analizaron inmediatamente en un instrumento Accuri C6 (BD Biosciences). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software FlowJo (v10.5).

Detección de proteínas expresadas en la superficie celular mediante citometría de flujo.

Una potente aplicación de los fluorofagos sería su utilización en la selección en tiempo real en FACS sin la necesidad de anticuerpos de tinción, sino solo basándose en la fluorescencia inherente de la fusión de fluoróforo-pVIII para la detección. Para evaluar esta posibilidad, los presentes inventores sometieron a ensayo el fluorofago de exposición de scFv H57-plX para la unión específica al receptor de células T expresado sobre células de hibridoma de células T SKW-3 R12-C9 humanas utilizando la citometría de flujo. Para la comparación, se prepararon fagos de exposición de scFv H57-plX sin la fusión de fluoróforo-pVIII y se sometieron a ensayo en paralelo.

Con el fin de verificar la unión específica a las células que expresaban TCR R12-C9 utilizando metodología estándar, los presentes inventores utilizando un anticuerpo anti-fd conjugado con APC para detectar los fagos unidos. Ello también permitió una comparación lado a lado del fluorofago y el fago normal unidos al TCR (figura 12A), y ninguno unido a SKW-3 humanas negativas para TCR (figura 12B). Al intentar teñir células sin la adición de un mAb de detección, no se observó ningún incremento de la intensidad de fluorescencia respecto a la de los controles (figura 12C), a pesar de la fuerte señal de fluorescencia observada del fluorofago scFv H57 cuando en solución (H57-mNGF03, figura 12D). De esta manera, aunque el fluorofago mostraba una señal fluorescente fuerte en solución, no se pudo detectar en la unión a antígeno ligado a superficie, mediante citometría de flujo. Ello significa que, aunque este fluorofago resulta altamente útil y ventajoso en muchos ensayos, p. ej., FLISA, tal como se describe posteriormente que comparte muchas similitudes y componentes con un ensayo de FACS, el fluorofago en esta forma todavía no alcanza el brillo por partícula necesario para permitir la tinción directa y separación por FACS de las células.

Ejemplo 4. Ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA) y ensayo de inmunosorción ligada a fluorescencia (FLISA).

Materiales y métodos.

Construcción de vectores de expresión TAT-ABC.

Los vectores que contenían los genes AC/B tat se diseñaron utilizando la herramienta de diseño Gensmart (Genscript Ltd.). Todos los constructos fueron producidos y controlada su calidad por Genscript Ltd. La fuente de la secuencia de TatB era NC_000913.3: 4022218-4022733 (NCBI) y la fuente de la secuencia de TatAC era n.º X73888.1 (European Nucleotide Archive). Para los fines de la detección, se fusionó TabC con una etiqueta 6xHIS C-terminal y TatC con una etiqueta FLAG C-terminal.

Construcción de células XL1-blue sobreexpresantes de Tat-AC/B que contienen el fagémido phOx-mNGF03.

Se transformaron células XL1-blue electrocompetentes con 1 ng de cada vector utilizando el protocolo estándar para el sistema de electroporación ECM399. Las células XL1-blue se cultivaron en agar LB que contenía 30 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de zeocina para seleccionar las células con ambos vectores de expresión. Se confirmó la expresión de TatC y TatB mediante análisis estándar de transferencia western utilizando anti-FLAG-M2 conjugado con peroxidasa de rábano picante (dilución 1:5000) y mAb anti-HIS (dilución 1:2000) en lisados de clones dobles positivos. Se seleccionaron 3 clones celulares basándose en sus niveles de expresión. Se transdujeron 10 ml de la totalidad de los tres clones celulares con fagos portadores de un fagémido que contenía phOx-plx y la fusión mNeonGreen-F03-pVIII. Se incubaron 10 µl de cultivo sobre agar LB que contenía 30 µg/ml de cloranfenicol, 50 µg/ml de zeocina, glucosa 500 mM y 100 µg/ml de ampicilina. Los clones resultantes se sometieron a ensayo basándose en su capacidad de emitir fluorescencia.

En el presente Ejemplo, en algunos experimentos se utilizaron células huésped XL-1 que habían sido manipuladas para sobreexpresar el transportador Tat tal como se ha descrito anteriormente, así como para expresar el fagémido phOx-mNGF03 con el fin de verificar si los niveles de fluorescencia podían mejorarse mediante sobreexpresión del transportador Tat.

Se muestran algunos resultados de ejemplo en la figura 14, en la que un cultivo durante la noche de células bacterianas en ausencia de glucosa muestra un gran incremento de la intensidad de fluorescencia e las células bacterianas que contienen el fagémido phOx-mNGF03 cuando el transportador Tat está sobreexpresado (XL1-blue TAT; phOx-mNGF03) en comparación con células bacterianas sin sobreexpresión de transportador Tat (XL1-blue; phOx-mNGF03).

- Además, con el fin de evaluar si se podía combinar o no la capacidad de exposición tanto una fusión funcional de fluoróforo-pVIII como una fusión funcional diferente en una cápside diferente de pVIII en la misma partícula fágica, los presentes inventores decidieron insertar un scFv anti-phOx bien descrito (Marks et al., 1992, *Biotechnology*, 10:779-783) en el fagémido expresante de fluoróforo-pVIII en forma de una fusión de pIX (este fagémido anti-phOx también se utilizó en algunos experimentos, anteriormente). A continuación, se prepararon fagos y se sometieron a ensayo para la unión de phOx en un ELISA clásico, además de FLISA, tal como se describe. Para la comparación, se prepararon fagos de exposición scFv anti-phOx-pIX sin la fusión de fluoróforo-pVIII y se sometieron a ensayo en paralelo.
- 5 Se midió la intensidad de fluorescencia de cantidades normalizadas de partículas fágicas en el lector de placas Varioskan LUX (figura 13D) y mostraron una intensidad de fluorescencia muy alta, y solo de los fagos que exponían la fusión de fluoróforo-pVIII. Nuevamente, al evaluar las partículas fágicas, el clon F03 mostró una fluorescencia mejorada por partícula fágica en comparación con el clon parental (wt).
- 10 Es importante, al someter a ensayo las mismas muestras fágicas para la unión a la diana de scFv en ELISA estándar, se observó unión específica con independencia de la presencia o ausencia de la fusión de fluoróforo-pVIII (figura 13C). De esta manera, los datos demuestran que la exposición de un fluoróforo en pVIII no afectó a la unión de antígeno mediada por la fracción de direccionamiento en la fusión de pIX en el fago de exposición dual. Al someter a ensayo nuevamente las mismas muestras fágicas para la unión de diana utilizando FLISA con el lector de placas Varioskan LUX, se pudo observar señal fluorescente de las partículas fágicas que estaban exponiendo mNGwt-pVIII (figura 13A, phOx-mNGwt) y la proteína de fusión mNGF03-pVIII (figura 13B), en particular al utilizar un título elevado de las células huésped bacterianas XL-1 sobreexpresantes de Tat (TAT alto). De esta manera, los datos muestran que la fluorescencia intrínseca de estas partículas fágicas es suficientemente alta para proporcionar sensibilidad para detectar específicamente la reducida cantidad de fagos retenida sobre la diana después del lavado en el FLISA y que estas partículas fágicas encuentran una utilidad ventajosa en tales ensayos, por ejemplo para permitir la detección cuando están unidas a antígeno. Cabe destacar que los datos muestran inequívocamente que la exposición dual de la fusión de fluoróforo-pVIII y la fusión de scFv-pIX en la misma partícula fágica no afecta al fenotipo de la fusión scFv-pIX.
- 20
- 25
- 30

REIVINDICACIONES

1. Constructo de vector que comprende los componentes siguientes:
 - (i) una secuencia codificante de un péptido de señal que dirige las proteínas hasta la ruta secretoria Tat, y
 - (ii) una secuencia codificante de un fluoróforo fusionado a una secuencia codificante de la proteína de cubierta fágica pVIII.
2. Constructo de vector según la reivindicación 1, en el que el fluoróforo es uno que presenta o comprende una estructura o arquitectura de barril β , preferentemente:

en el que el fluoróforo es GFP, un derivado de GFP o presenta arquitectura de GFP, más preferentemente: en el que el fluoróforo es mNeonGreen o una variante del mismo.
3. Constructo de vector según la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido de señal es TorA o una variante del mismo, preferentemente:

en el que la variante de TorA es Tor AB7 o una variante del mismo.
4. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína de cubierta fágica pVIII correspondiente a la proteína de cubierta pVIII del fago M13, fd o f1, o una variante de la misma; preferentemente en el que la proteína de cubierta fágica pVIII comprende la SEC ID n.º 8, o en la que la secuencia variante es una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 8.
5. Constructo de vector según la reivindicación 4, en el que la proteína de cubierta fágica pVIII o secuencia variante presenta una mutación de valina a isoleucina en la posición 33 de la SEC ID n.º 8 o una posición correspondiente, preferentemente:

en el que la secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicho residuo de isoleucina comprende el codón ATA.
6. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína de cubierta fágica pVIII comprende la SEC ID n.º 25, o en el que la secuencia variante es una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 25.
7. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector comprende, además, una secuencia codificante de un conector entre el fluoróforo y la proteína de cubierta fágica pVIII.
8. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector comprende, además, una secuencia codificante de una etiqueta detectable, preferentemente:

en el que la etiqueta es una etiqueta FLAG o un derivado de la misma, u otra etiqueta con carga negativa.
9. Constructo de vector según la reivindicación 8, en el que la etiqueta está localizada entre el péptido de señal y el fluoróforo.
10. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el vector comprende, además, uno o más sitios de unión ribosómica (RBS), preferentemente:

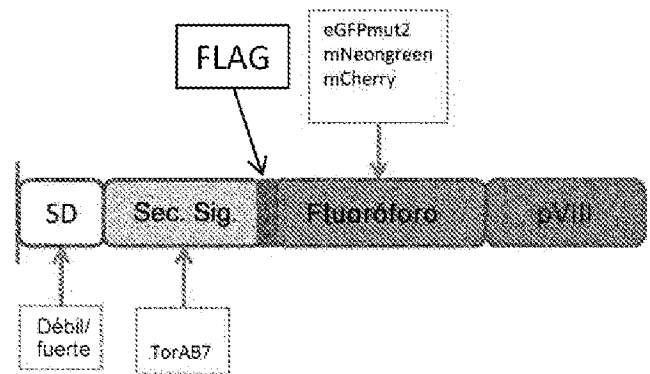
en el que el RBS que controla la traducción de la proteína de fusión de fluoróforo-pVIII es un RBS débil.
11. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el constructo de vector codifica una secuencia que comprende la SEC ID n.º 16 o una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 70 % respecto a la misma.
12. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el constructo de vector codifica una secuencia que comprende: (i) SEC ID n.º 18 o una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 70 % respecto a la misma, (ii) SEC ID n.º 20 o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la misma, o (iii) SEC ID n.º 22 o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la misma.
13. Constructo de vector según la reivindicación 12, en el que la proteína de cubierta fágica pVIII o secuencia variante presenta una mutación de valina a isoleucina en la posición correspondiente a la posición 33 de la SEC ID n.º 8, preferentemente:

en el que la secuencia de ácidos nucleicos codificante de dicho residuo de isoleucina comprende el codón ATA.

- 5 14. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el constructo de vector comprende, además, una secuencia codificante de una proteína de interés fusionada a una secuencia codificante de una proteína de cubierta fágica no pVIII.
- 10 15. Constructo de vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el vector es un vector fagémido o un vector fago.
- 15 16. Constructo de vector según la reivindicación 2, en el que mNeonGreen comprende la SEC ID n.º 4, o en el que la secuencia variante es una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 4, o el constructo de vector según la reivindicación 3, en el que Tor AB7 comprende la SEC ID n.º 2 o en el que la secuencia variante es una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 2, o el constructo de vector según la reivindicación 5, en el que la proteína de cubierta fágica pVIII comprende la SEC ID n.º 61, o una secuencia con una identidad de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 61, o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEC ID n.º 60 o una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 70 % respecto a la SEC ID n.º 60.
- 20 17. Molécula de ácidos nucleicos que comprende los componentes tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 25 18. Partículas fágicas que comprenden los vectores o moléculas de ácidos nucleicos tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y que expresan una proteína de fusión de fluoróforo-pVIII sobre la superficie, preferentemente:
en donde dichas partículas fágicas son partículas de un fago filamentoso.
- 30 19. Biblioteca de partículas fágicas, en la que las partículas fágicas son tal como se define en la reivindicación 18, y en la que se expresan múltiples proteínas de interés diferentes sobre la superficie de las partículas fágicas.
- 35 20. Sistema de exposición fágica que comprende un constructo de vector o molécula de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que opcionalmente comprende además una célula huésped de *E. coli* que sobreexpresa las proteínas Tat A, Tat B y Tat C.
- 40 21. Método para producir partículas fágicas fluorescentes, que comprende la utilización de un constructo de vector o molécula de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o el sistema de exposición fágica según la reivindicación 20.

Figura 1

A



B

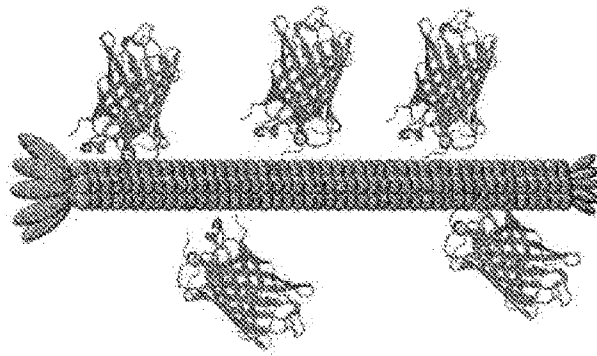
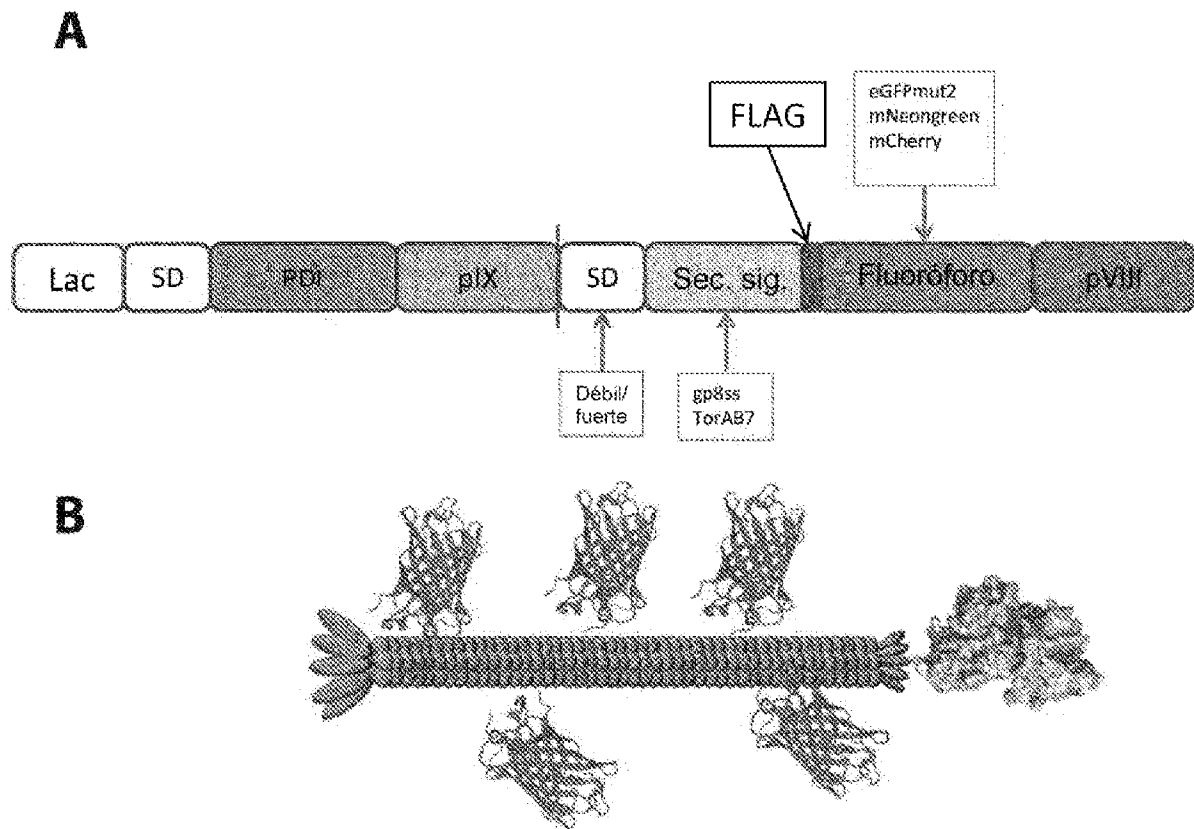


Figura 2



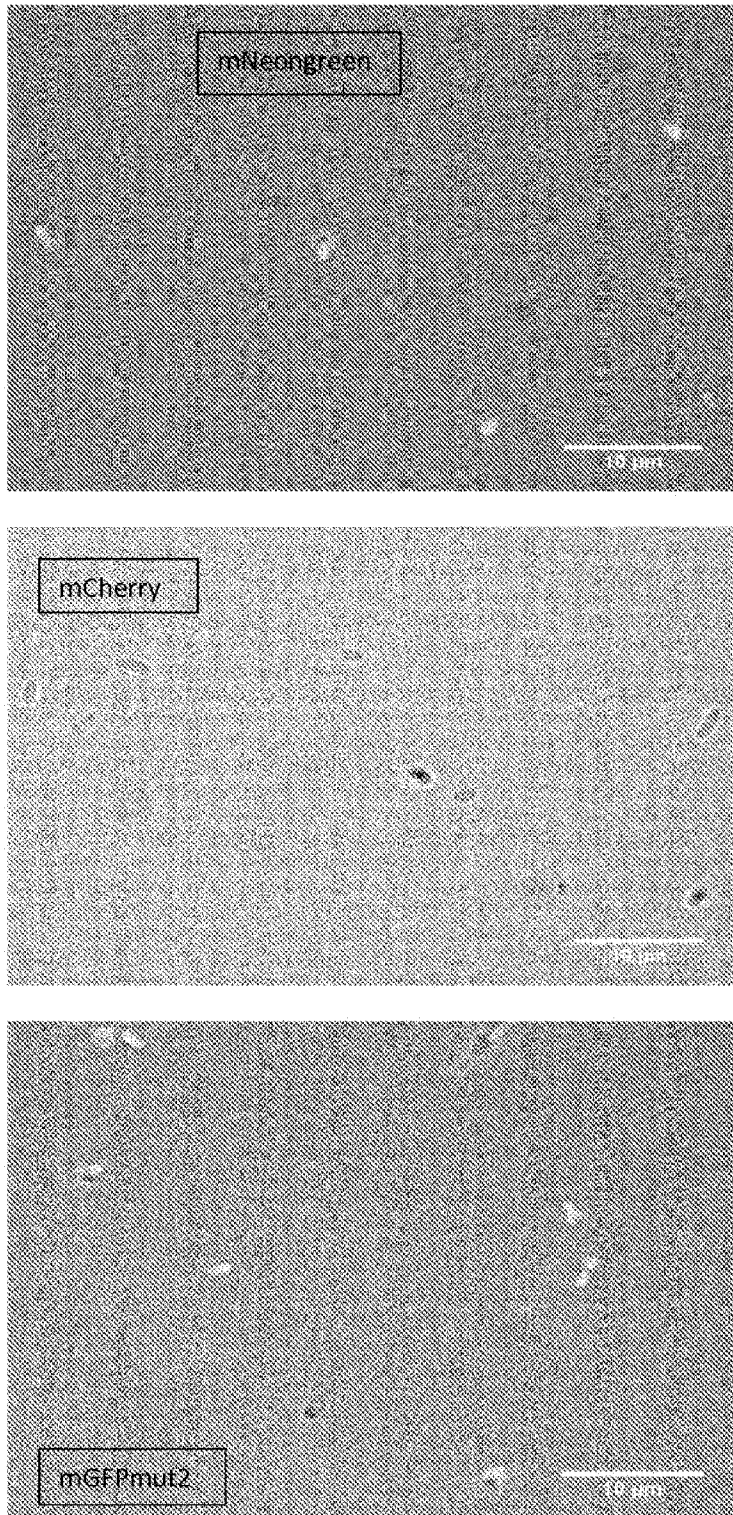


Figura 3

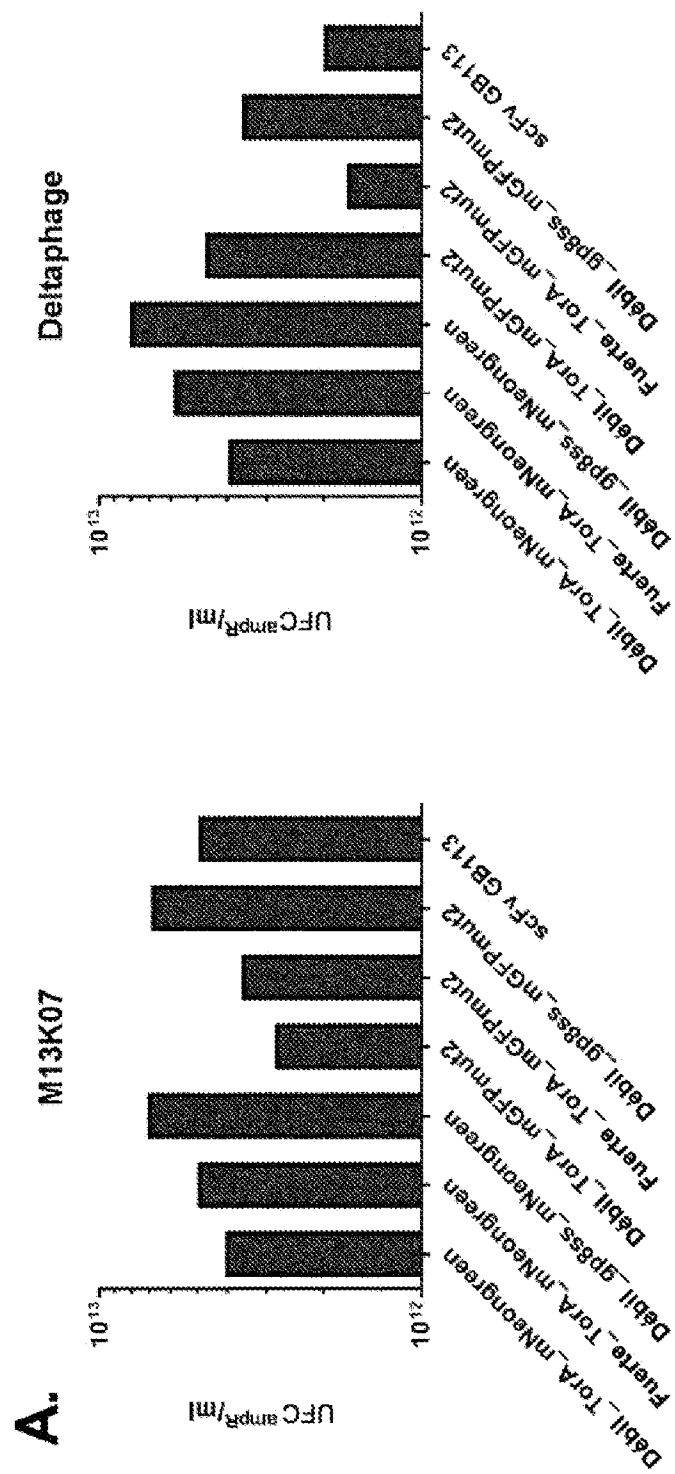


Figura 4

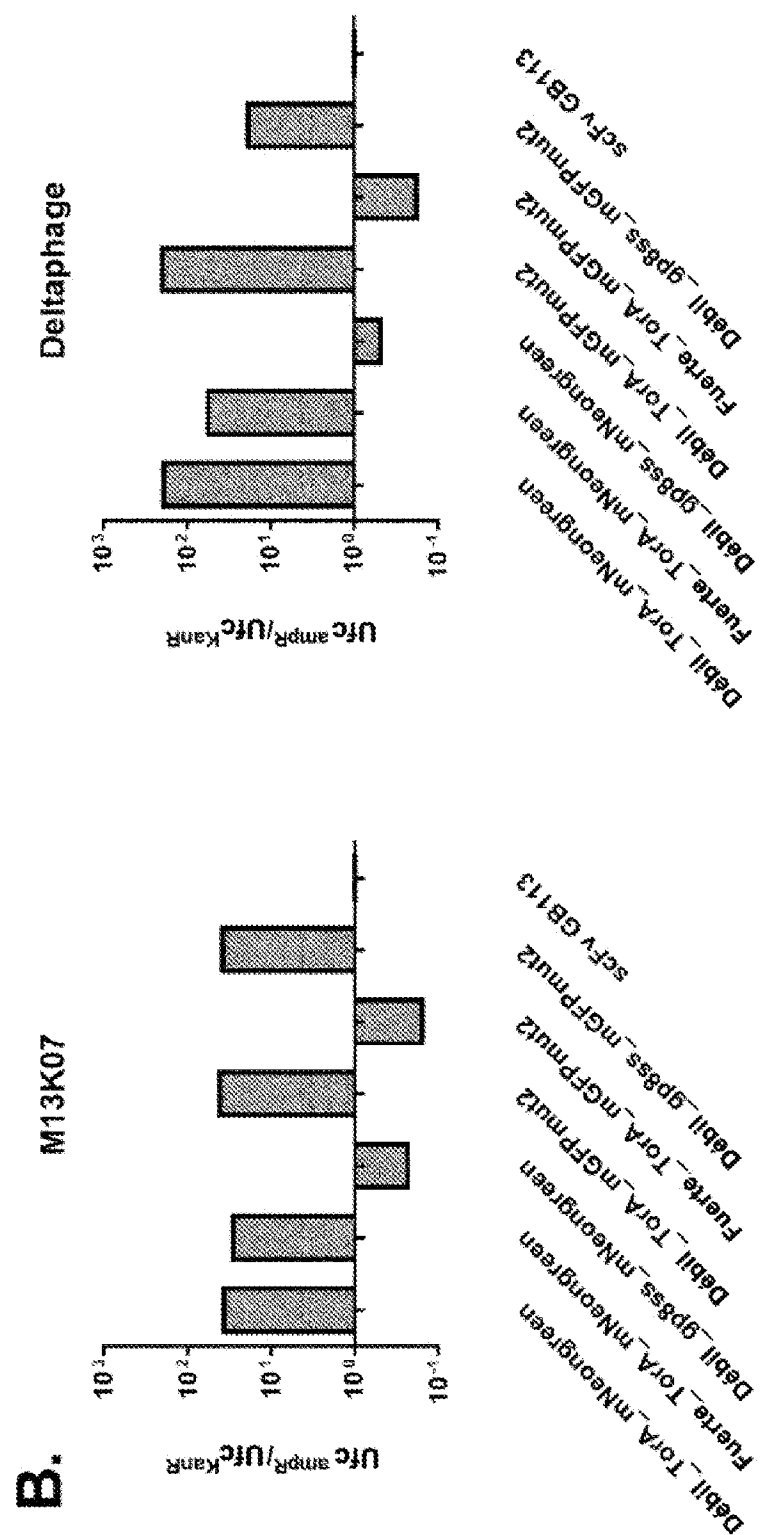


Figura 4 (continuación)

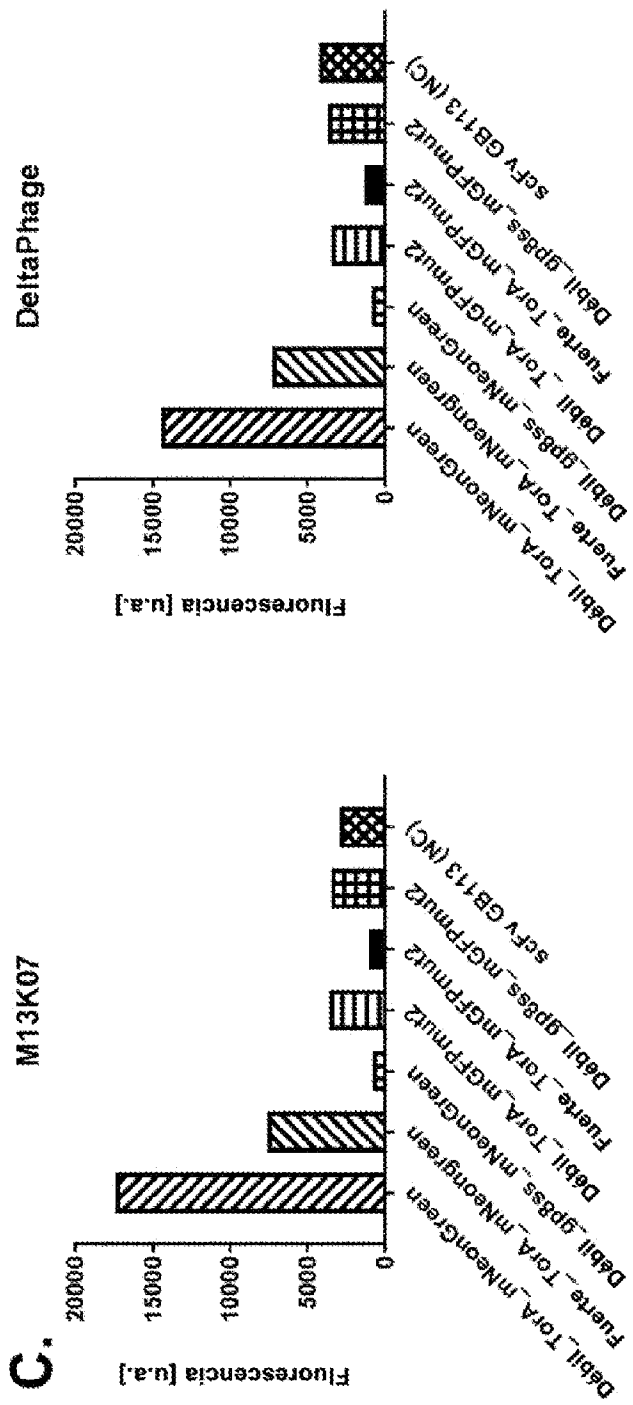


Figura 4 (continuación)

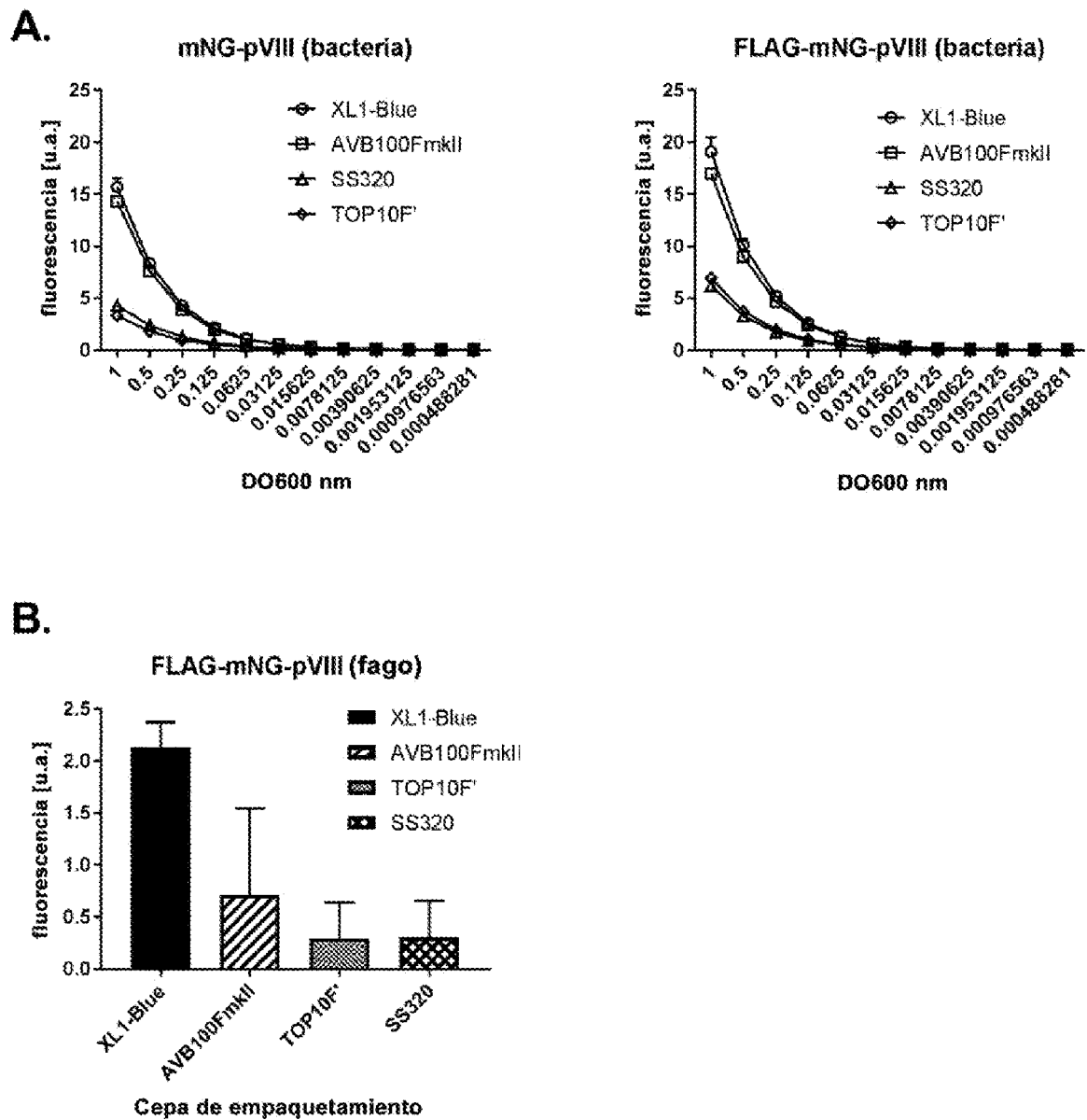


Figura 5

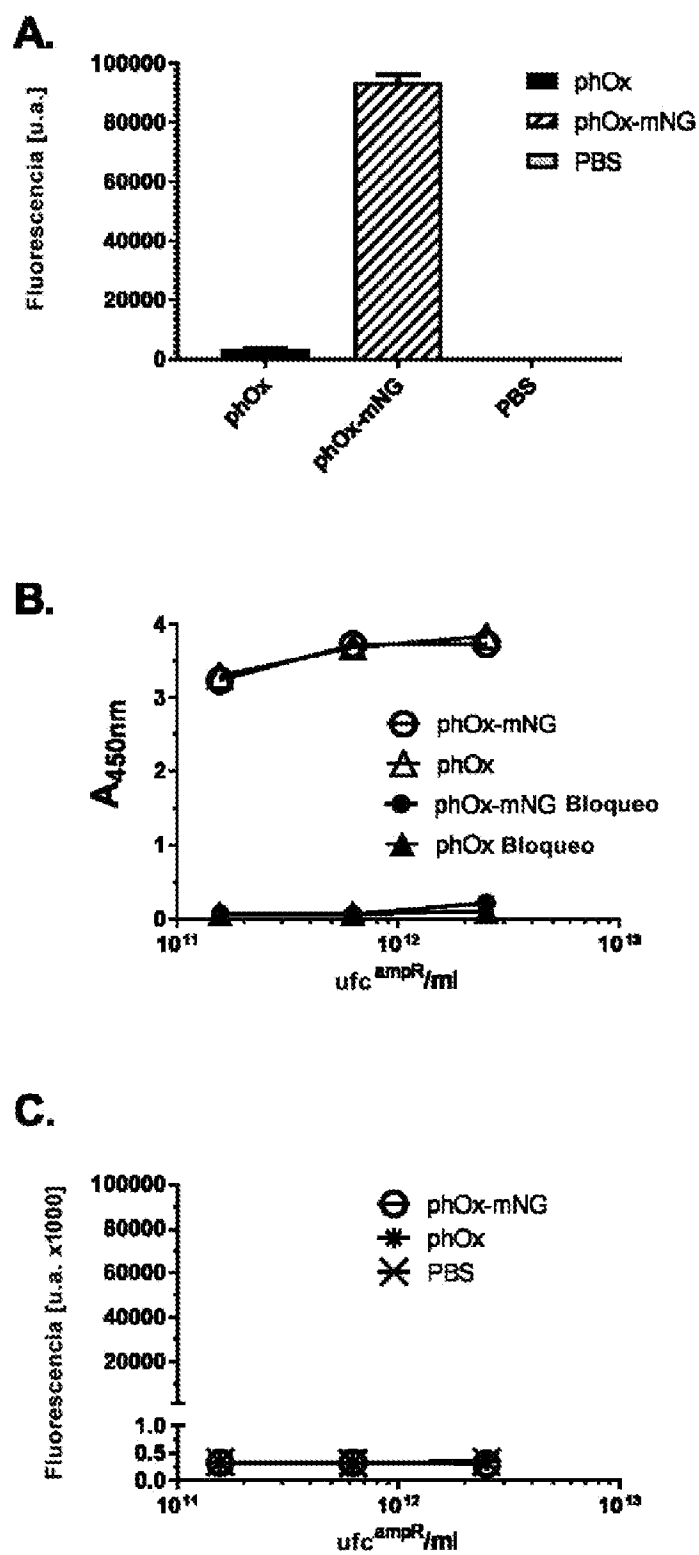


Figura 6

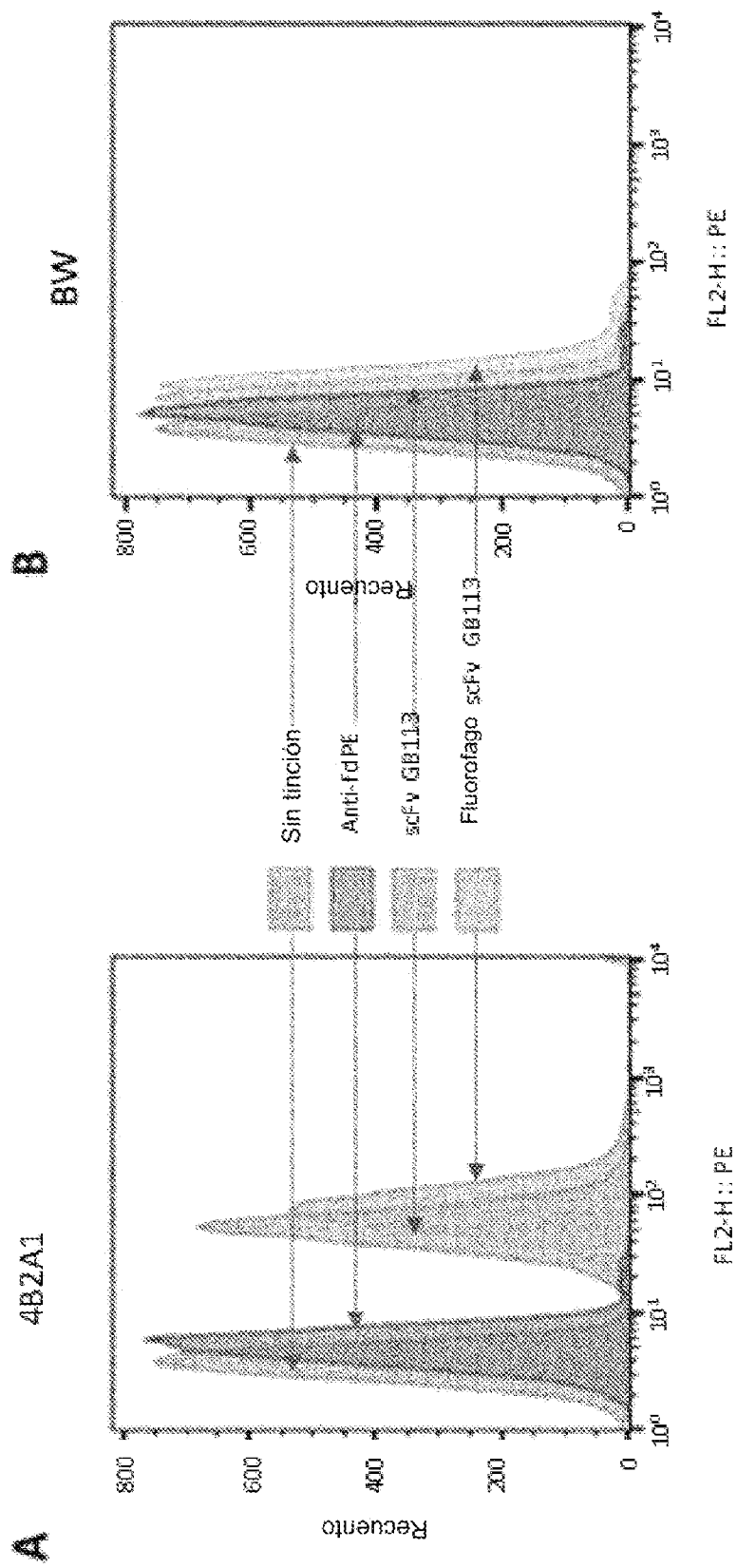


Figura 7

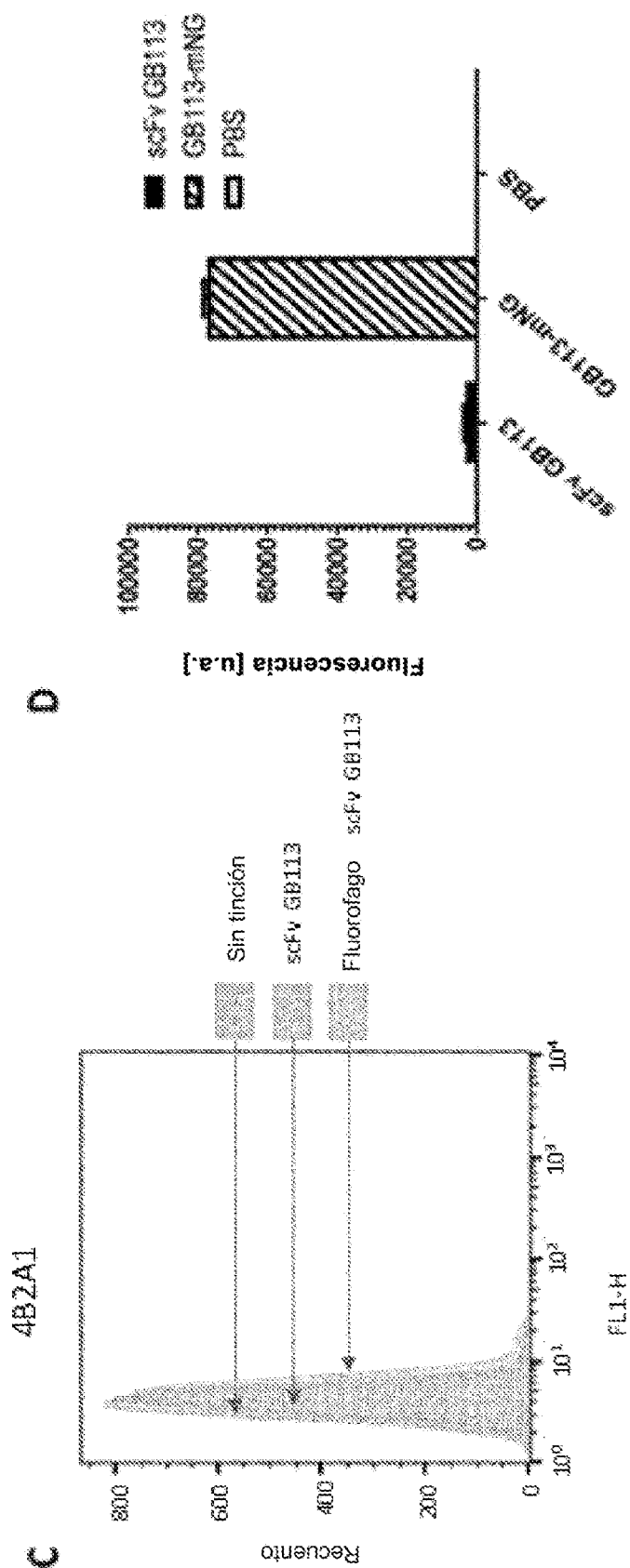


Figura 7 (continuación)

Figura 8

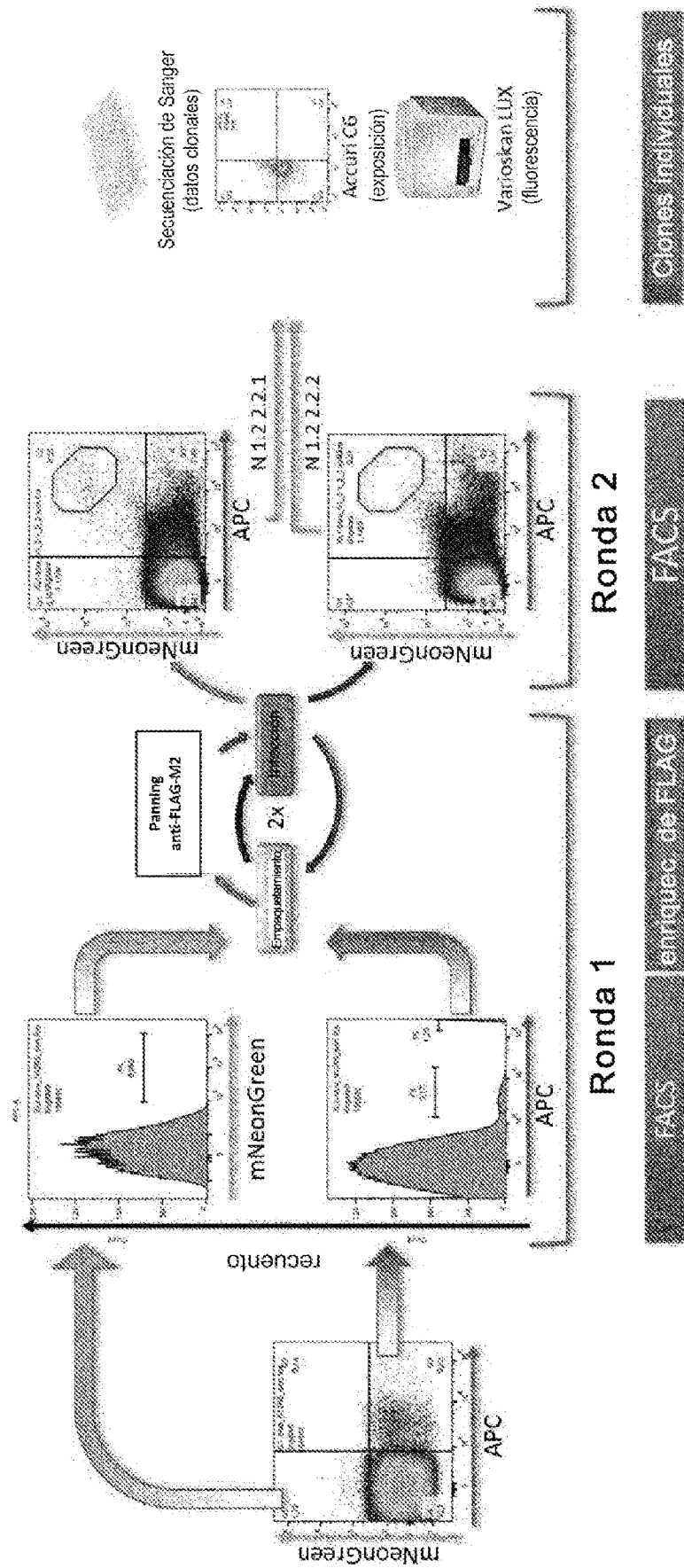


Figura 9

```

1 ATGAACAATAACGATCTCTTTTCAGACATCACGTCAGCGTTTTTTGGCACAACTCGGCGGC 60
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 M N N N D L F Q T S R Q R F L A Q L G G 20
  |← -----TorAB7 secuencia de aminoácidos INICIO-----

61 TTAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAACGCCGCGACGTGCGACTGCGGCG 120
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
21 L T V A G M L G P S L L T P R R A T A A 40
  -----TorAB7 secuencia de aminoácidos FINAL-- ...|

121 GattacaaggatgacgatgacaagGGCGTTTCTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCTTCT 180
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
41 D Y K D D D D K G V S K G E E D N M A S 60
  |← aminoác. etiqueta FLAG →| |← ----- aminoácidos mNeonGreen

181 CTGCCGGCTACCCACGAAGTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTGACTTCGACATG 240
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 L P A T H E L H I F G S I N G V D F D M 80
  secuencia INICIO-----

241 GTTGGTCAGGGTACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAACTGAACCTGAAATCTACC 300
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
81 V G Q G T G N P N D G Y E E L N L K S T 100
  -----

301 AAAGGTGACCTGCAGTTCTCTCCGTGGATCTTAGTTCCGCACATCGGTTACGGTTTCCAC 360
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
101 K G D L Q F S P W I L V P H I G Y G F H 120
  -----

361 CAGTACCTGCCGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCTGCTATGGTTGACGGTTCT 420
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 Q Y L P Y P D G M S P F Q A A M V D G S 140
  -----

421 GGTTACCAGGTTACCGTACCATGCAGTTCTGAAGACGGTGCTTCTCTGACCGTTAACTAC 480
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
141 G Y Q V H R T M Q F E D G A S L T V N Y 160
  -----

481 CGTTACACCTACGAAGGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCTCAGGTTAAAGGTACCGGTTTC 540
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
161 R Y T Y E G S H I K G E A Q V K G T G F 180
  -----

541 CCGGCTGACGGTCCGGTTATGACCAACTCTCTGACCGCTGCTGACTGGTGCCGTTCTAAA 600
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 P A D G P V M T N S L T A A D W C R S K 200
  -----

601 AAAACCTACCCGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTTACACCACCGGT 660
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
201 K T Y P N D K T I I S T F K W S Y T T G 220
  -----

```

```

661 AACGGTAAACGTTACCGTTCTACCGCTCGTACCACCTACACCTTCGCTAAACCGATGGCT 720
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
221 N G K R Y R S T A R T T Y T F A K P M A 240
-----

721 GCTAACTACCTGAAAAACCGATGTACGTTTTCCGTAAAACCGAACTGAAACACTCT 780
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
241 A N Y L K N Q P M Y V F R K T E L K H S 260
-----

781 AAAACCGAACTGAACTTCAAAGAATGGCAGAAAGCTTTACCGACGTTATGGGTATGGAC 840
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
261 K T E L N F K E W Q K A F T D V M G M D 280
-----
                secuencia de aminoác. mNeonGreen

841 GAACTGTACAAAGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGCAGCGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAA 900
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
281 E L Y K G G G S G G G S A E G D D P A K 300
FINAL ----->| |<- aminoác. conector ----->| |<- aminoácidos de pVIII

901 GCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATG 960
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
301 A A F N S L Q A S A T E Y I G Y A W A M 320
secuencia INICIO -----

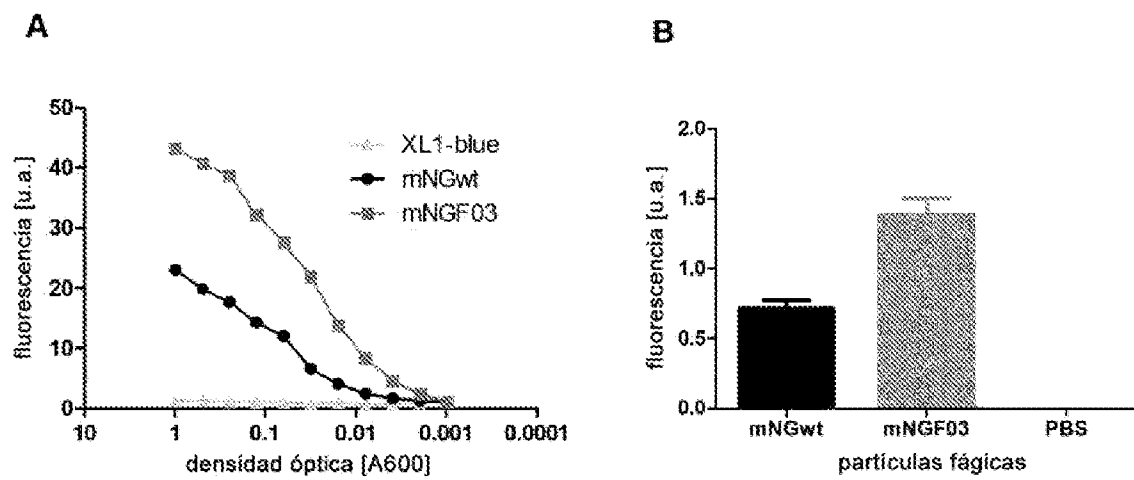
961 GTTGTGTGTCATTGTTCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAA 1020
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
321 V V V I V G A T I G I K L F K K F T S K 340
-----
                secuencia aminoác. de pVIII

1021 GCAAGCTGATAA 1032
-----:-----|-----
341 A S * * 342
FINAL..|

```

Figura 9 (continuación)

Figura 10



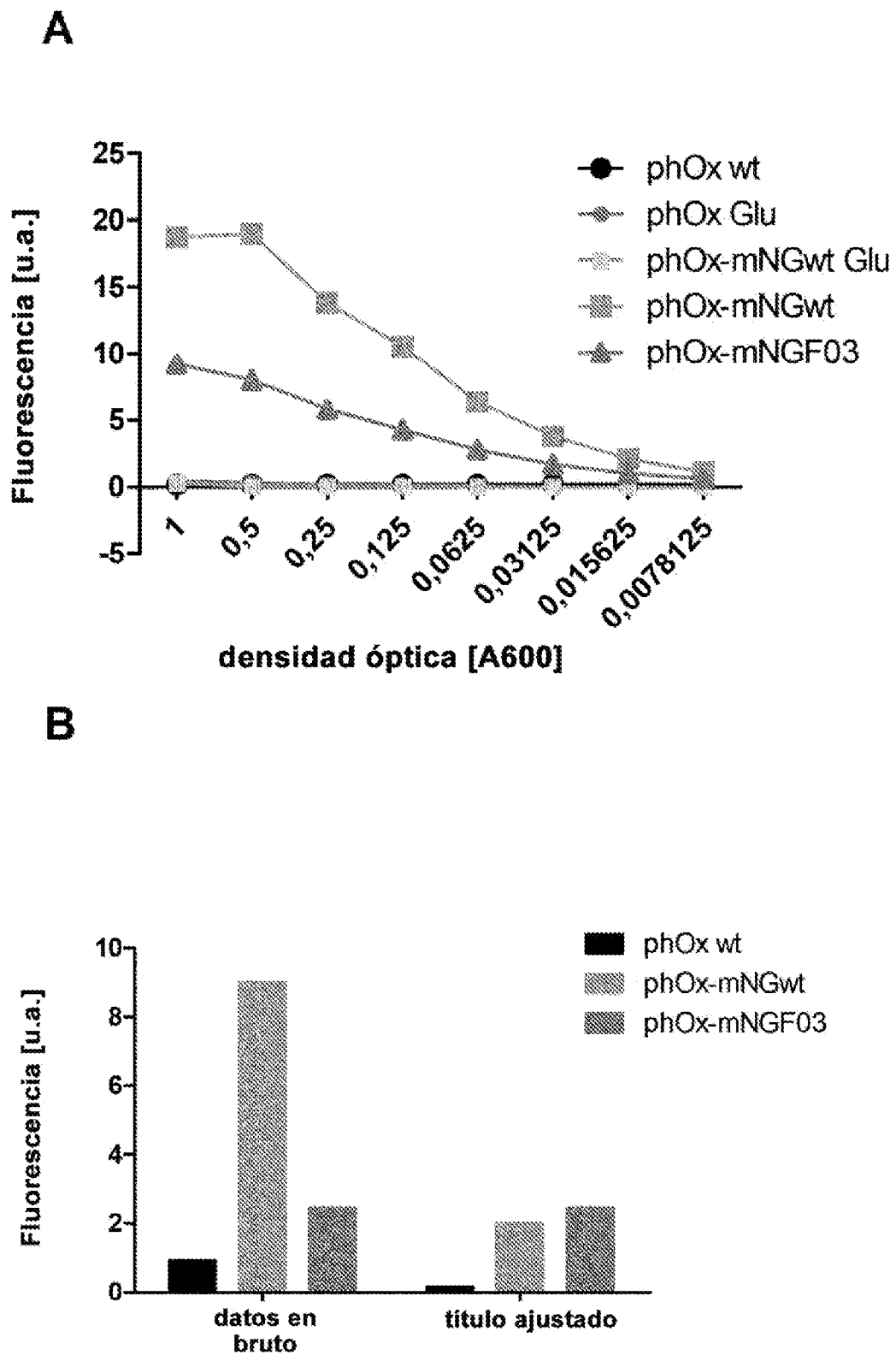


Figura 11

Figura 12

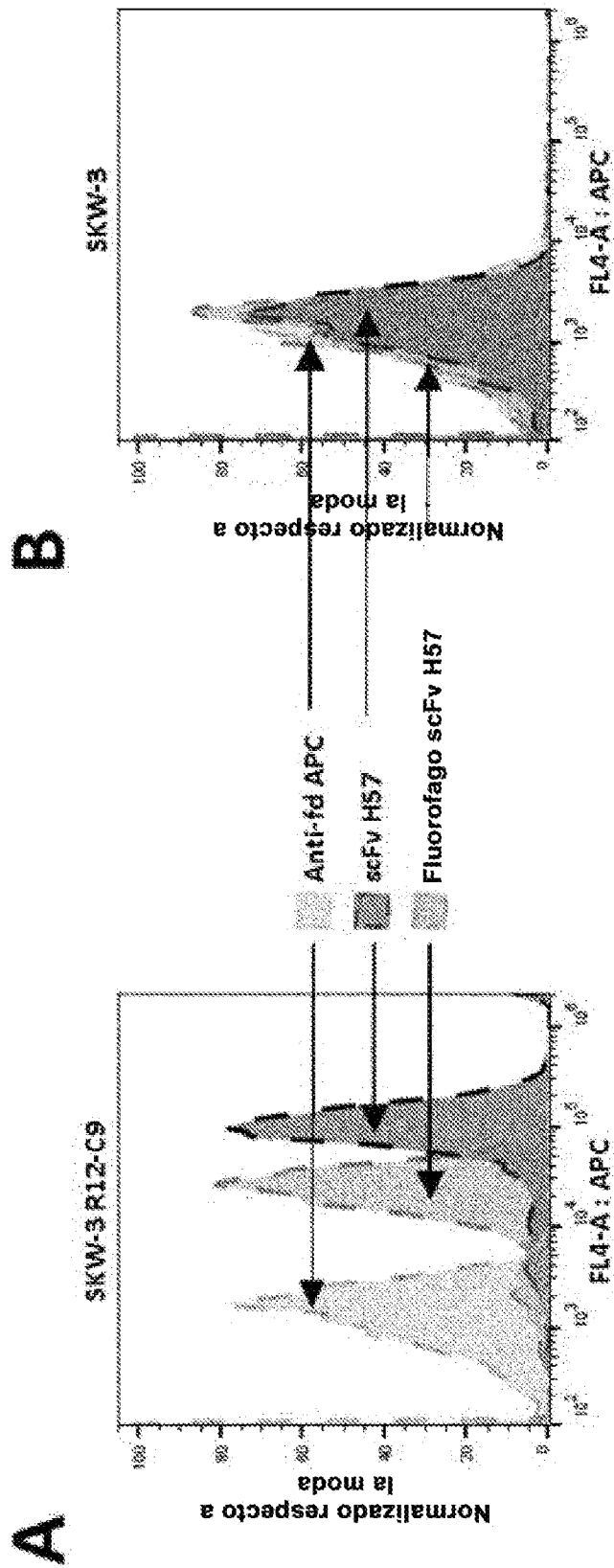


Figura 12 (continuación)

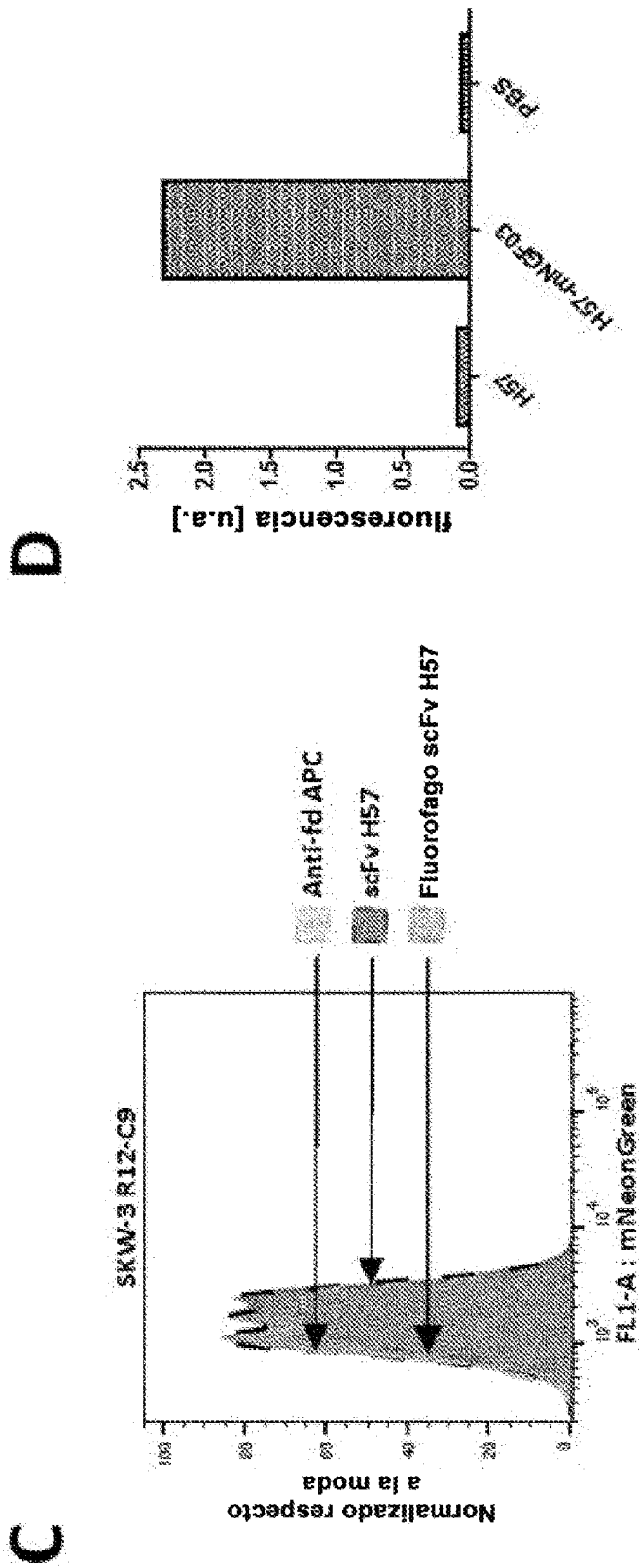


Figura 13

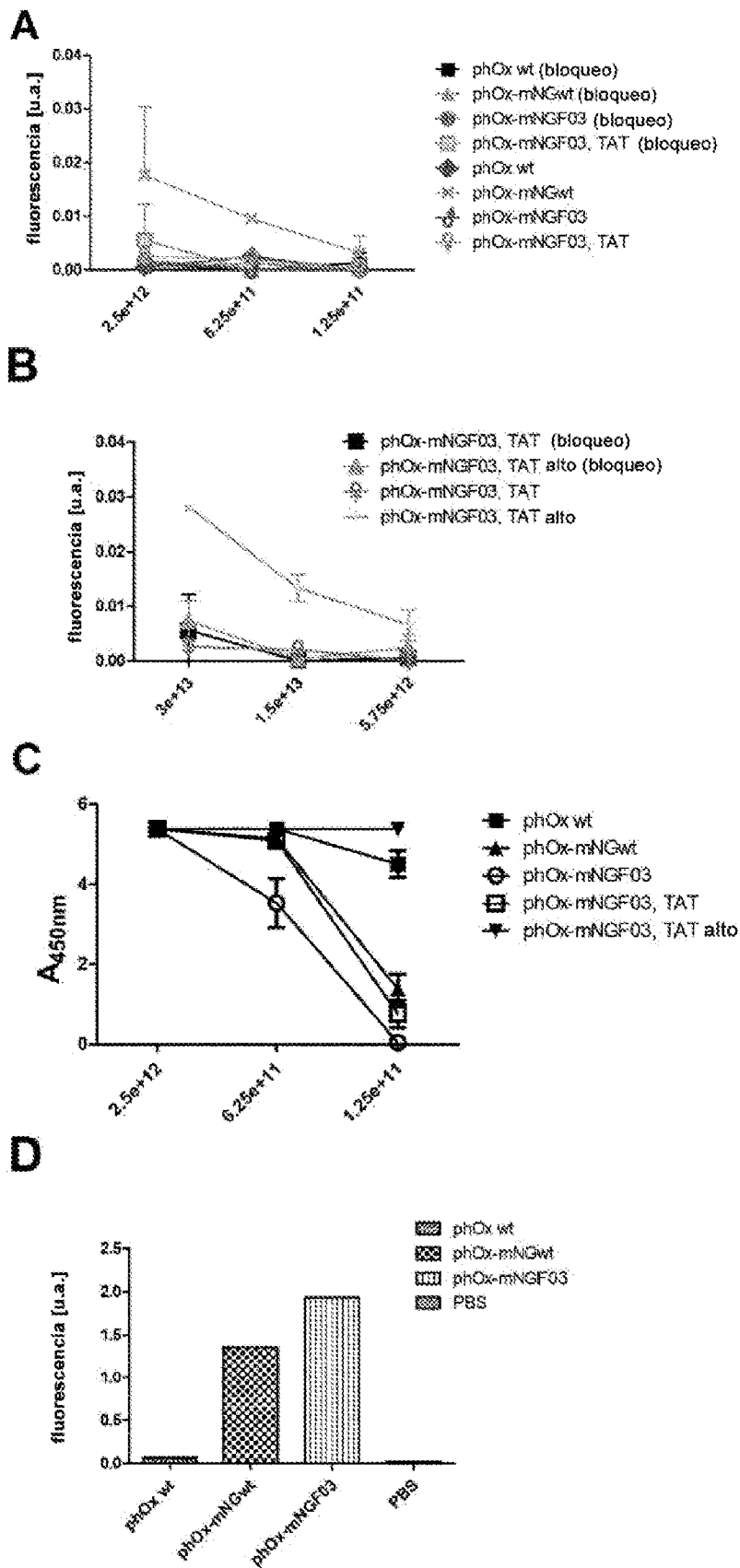


Figura 14

