

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 833 254**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2017** **PCT/EP2017/073369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018** **WO18050871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2017** **E 17771399 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020** **EP 3512878**

54 Título: **Presentación de anticuerpos biespecíficos sobre la superficie de fagos**

30 Prioridad:

15.09.2016 US 201662395139 P

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

14.06.2021

73 Titular/es:

NOVIMMUNE SA (100.0%)
14 ch. Des Aulx, Plan-Les Ouates
1228 Geneva, CH

72 Inventor/es:

FAGÈTE, SÉVERINE;
HARTLEY, OLIVER y
FISCHER, NICOLAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 833 254 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Presentación de anticuerpos biespecíficos sobre la superficie de fagos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al campo de las composiciones de presentación de anticuerpos en fagos y métodos que permiten que pares de anticuerpos se seleccionen simultáneamente basándose en el acoplamiento conjunto de sus dianas respectivas. Las composiciones y los métodos incorporados en la presente invención son útiles para el desarrollo de anticuerpos biespecíficos.

Antecedentes de la invención

10 La presentación en fagos es una poderosa tecnología de evolución *in vitro* que permite que ligandos raros con características deseadas se aislen de grandes bibliotecas de variantes codificadas por y expresadas en la superficie de bacteriófago filamentosos. Actualmente se usan terapéuticamente muchos anticuerpos identificados por la presentación en fagos o están en desarrollo clínico. Aunque se ha usado hasta la fecha la presentación en fagos de anticuerpos para descubrir anticuerpos biespecíficos, el proceso no se ha optimizado para asegurar que la selección se base en el acoplamiento conjunto. Además, no se han usado otras técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, tecnología de diacuerpos de fago) para la selección directa basada en el acoplamiento conjunto y la aplicación más amplia de la tecnología de diacuerpos de fago puede no ser posible debido a dificultades en la construcción de repertorios de diacuerpos. Las diferencias en la geometría del sitio de unión al antígeno de los diacuerpos frente a las moléculas de inmunoglobulina pueden comprometer su utilidad para la traducción en formatos de anticuerpos biespecíficos basados en inmunoglobulina. McGuinness B.T. et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14(9): 1149-1154 describen la construcción de bibliotecas que contienen moléculas de diacuerpos biespecíficos.

Así, existe una necesidad de composiciones y métodos de presentación en fagos que permitan seleccionar conjuntamente pares de anticuerpos basándose en el acoplamiento conjunto de sus dianas respectivas.

Sumario de la invención

El alcance de la invención se explica en las reivindicaciones adjuntas.

25 Brevemente, en el presente documento se proporcionan sistemas de presentación para presentar simultáneamente dos polipéptidos de unión a ligando en la superficie de un fago. Dichos sistemas incluyen un fagémido que contiene la secuencia codificante de un primer polipéptido de unión a ligando fusionado en marco con un primer dominio de dimerización y con una proteína de la superficie externa del fago; un plásmido que contiene la secuencia codificante de un segundo polipéptido de unión a ligando fusionado en marco con un segundo dominio de dimerización; y un fago auxiliar que contiene secuencias codificantes de todas las proteínas necesarias para encapsidar el fago. En estos sistemas, el primer y el segundo polipéptidos de unión a ligando son diferentes y se unen entre sí a un ligando diana diferente. Cuando se fusiona el primer y segundo polipéptido de unión a ligando y todas las proteínas de fago se expresan en una célula hospedadora adecuada, las fusiones de los dos polipéptidos de unión a ligando se asocian por sus dominios de dimerización respectivos, dando como resultado la presentación simultánea de los dos polipéptidos de unión a ligando en la superficie de fago.

En el presente documento también se proporciona kits del sistema de presentación en una encapsidación adecuada junto con instrucciones para su uso.

40 También se proporcionan métodos de presentación de dos polipéptidos de ligando sobre la superficie de un fago que provocan que cualquiera del sistema de presentación descrito en el presente documento se transcriba y traduzca en una célula hospedadora adecuada.

Además, se proporcionan métodos para detectar una interacción específica simultánea entre uno o más agentes de prueba y los dos polipéptidos de unión a ligando presentados sobre la superficie de un fago. En dichos métodos, los fagos que presentan los dos o más polipéptidos de unión a ligando presentados sobre la superficie que usan los sistemas de presentación descritos en el presente documento se ponen en contacto con el uno o más agentes de prueba en condiciones adecuadas para producir un complejo estable entre los polipéptidos de unión a ligando y el uno o más agentes de prueba y se detecta la formación de un complejo estable (si lo hay).

Breve descripción de los dibujos

50 Las Figuras 1A-B proporcionan una visión general del sistema de presentación doble. En la Figura 1A, se proporcionan secuencias de los dominios de cremallera de leucina complementarios (Z1 y Z2). La Figura 1B es la representación esquemática del sistema de expresión de dos replicones usado para producir el fago de presentación doble.

La Figura 2 muestra la actividad de unión de diversas construcciones de fago de presentación doble producidas en *E. coli* que expresan un scFv de componente soluble anti-CD3. Los fagémidos que llevan los componentes de fago indicados se rescataron en los plásmidos que alojaban *E. coli* que codificaban o anti-CD3-Z1 o anti-CD3-Z2 como

componentes solubles, y los fagos rescatados se probaron por ELISA para su capacidad para unirse a péptido CD3 inmovilizado. Las barras representan la media y el intervalo de mediciones duplicadas.

Las Figuras 3A-C muestran que la selección de fago está conducida por el anticuerpo de componente soluble incorporado. La Figura 3A muestra un esquema de clones de fago que codifican o anti-IFN γ -Z1 o anti-IFN γ -Z2 a medida que el componente de fago se somete a rondas de selección que consistían en la infección y el rescate en *E. coli* que expresa anti-CD3-Z2 como el componente soluble seguido por la inmunopurificación contra el péptido CD3 inmovilizado. Solo cabría esperar que el fago con el componente de fago anti-IFN γ -Z2 tuviera la capacidad de adquirir el componente soluble anti-CD3-Z1. La Figura 3B muestra los resultados del ensayo de ELISA para unirse al péptido CD3 inmovilizado que se realiza en la mezcla de fagos inicial, así como en poblaciones de fagos obtenidas después de cada ronda de selección. Se realizan tres experimentos de selección diferentes con el fago IFN γ -Z2 inicialmente diluido en el fago IFN γ -Z1 a 1:10, 1:1000 y 1:100000. La Figura 3C muestra los resultados del ensayo de ELISA como en la Figura 3B, excepto que las rondas de selección se llevaron a cabo sin inmunopurificación en péptido CD3 inmovilizado.

Las Figuras 4A-B muestran la estrategia de selección basada en la capacidad del fago de presentación doble para acoplar dos estructuras diana diferentes. En la Figura 4A se usaron cuatro clones de fago capaces de acoplar CCR5 solo, péptido CD3 solo, ambas estructuras, o ninguna estructura, junto con las células que expresan CCR5 marcado con el péptido CD3. La Figura 4B es un diagrama de flujo que representa el proceso de selección.

La Figura 5 muestra la secuencia del vector pcDNA3.1 que codifica una marca de epítipo CD3 fusionada en el extremo N con CCR5 humano y la secuencia del sitio de clonación XbaI en el esqueleto de pcDNA3.1 con la región que codifica los restos del extremo N de CCR5.

La Figura 6 muestra la caracterización de la línea celular CHO-CD3-CCR5 usada. Se incubaron las células CHO (CHO-WT) o CHO-CD3-CCR5 no transfectadas con anticuerpos específicos para o CCR5 o el epítipo de péptido CD3 como se indica y se analiza por citometría de flujo.

La Figura 7A muestra mapas del fagémido de partida, pNDS, y la Figura 7B muestra los sitios de restricción únicos pNDS-DD del fagémido final y las características clave.

La Figura 8 muestra las modificaciones de secuencia hechas a pNDS para generar pNDS-DD. Se proporciona en el presente documento la versión que codifica el dominio Z1 de la cremallera de leucina como un ejemplo, con la secuencia del fagémido del sitio NotI en la dirección hacia la región que codifica los restos del extremo N de la proteína 3 del gen M13.

La Figura 9A muestra mapas del plásmido de partida, pCDF-1b, y la Figura 9B muestra los sitios de restricción seleccionados del fagémido final pCDF-1b-DD y las características clave.

La Figura 10A muestra las modificaciones de secuencia hechas a pCDF-1b para generar pCDF-1b-DD, mostrando la secuencia de pCDF-1b el sitio de clonación múltiple (MCS) más regiones flanqueantes. El sitio de inserción del sitio SphI se indica con una flecha. En la Figura 10B, la secuencia de pCDF-1b-DD desde el sitio NotI situado en la dirección 3' de fragmentos scFv codificados hacia el sitio PacI en el esqueleto pCDF-1b con la versión que codifica el dominio de cremallera de leucina Z1 proporcionado en el presente documento como un ejemplo.

Descripción detallada

En el presente documento se proporciona una presentación en sistemas de fagos, composiciones y métodos para la presentación doble de dos polipéptidos de unión a ligando diferentes (es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), sobre la superficie del fago (por ejemplo, un bacteriófago filamentoso). Cuando el sistema se expresa en una célula hospedadora adecuada, los dos polipéptidos tienen una geometría y/o distancia de separación molecular que se parece a la de los dos sitios de unión al antígeno en una inmunoglobulina intacta. Estos sistemas, composiciones y métodos usan un sistema de replicón doble que es fácilmente compatible con el uso de grandes repertorios de anticuerpos intactos y se pueden usar para acoplar simultáneamente dos dianas definidas por el usuario diferentes.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos científicos y técnicos usados a propósito de la presente invención deben tener los significados que son comúnmente entendidos por los expertos habituales en la técnica, además, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular deben incluir pluralidades y los términos en plural deben incluir el singular. En general, nomenclatura utilizada a propósito de y técnicas de cultivo celular y de tejido, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo- o polipéptidos descritos en el presente documento y las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas convencionales se usan para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejido (por ejemplo, electroporación, Lipofectin). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica como se describe en el presente documento. Las técnicas y los procedimientos anteriores se realizan, en general, según los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y

como se describe en el presente documento en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se tratan en toda la presente memoria descriptiva (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*).

En el contexto de la presente solicitud, los siguientes términos se definen del siguiente modo:

- 5 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ("inmunorreacciona con") un antígeno. Estructuralmente, el anticuerpo que existe de forma natural más simple (por ejemplo, IgG) contiene cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) conectadas entre sí por enlaces disulfuro. Las inmunoglobulinas representan una gran familia de moléculas que incluyen varios tipos de moléculas, tales como IgD, IgG, IgA, IgM e IgE.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo biespecífico" se refiere a una proteína artificial que está compuesta por fragmentos de dos anticuerpos monoclonales diferentes y, por consiguiente, se une a dos tipos de antígeno diferentes.

- 15 El término "molécula de inmunoglobulina" incluye, por ejemplo, anticuerpos híbridos, o anticuerpos alterados, y fragmentos de los mismos.

- "Antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que es reconocida y se une específicamente por un anticuerpo. Los antígenos pueden incluir, por ejemplo, péptidos, proteínas, glucoproteínas, polisacáridos y lípidos; equivalentes y combinaciones de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "antígenos de superficie" se refiere a los componentes de la membrana plasmática de una célula y engloba las proteínas integrales y periféricas de la membrana, glucoproteínas, polisacáridos y lípidos que constituyen la membrana plasmática. Una "proteína integral de la membrana" es una proteína transmembranaria que se extiende a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática de una célula. Una proteína integral de la membrana típica contiene al menos un "segmento transmembranario" que comprende, en general, restos de aminoácidos hidrófobos. Las proteínas periféricas de la membrana no se extienden dentro del interior hidrófobo de la bicapa lipídica y están unidas a la superficie de la membrana por interacción no covalente con otras proteínas de la membrana.

- "Fragmentos de anticuerpos" incluyen una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente con la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un fragmento variable de una sola cadena (scFv) es normalmente una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de inmunoglobulinas que se conectan con un péptido conector corto de 10 a aproximadamente 25 aminoácidos. El conector es normalmente rico en glicina para su flexibilidad, así como serina o treonina para solubilidad. El conector puede conectar los extremos N de VH con los extremos C de VL, o viceversa.

- 35 "Diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, que incluyen un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VW-VL). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento de patente EP 404.097; el documento de patente WO 93111161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

- "Dominio" se refiere a una porción de una proteína que se distingue física o funcionalmente de otras porciones de la proteína o péptido. Los dominios físicamente definidos incluyen las secuencias de aminoácidos que son excepcionalmente hidrófobas o hidrófilas, tales como secuencias que están asociadas a la membrana o asociadas al citoplasma. Los dominios también se pueden definir por homología interna que surgen, por ejemplo, de la duplicación génica. Los dominios funcionalmente definidos tienen una función (funciones) biológica(s) distinta(s). Por ejemplo, el dominio de unión a ligando de un receptor es el dominio que se une al ligando. Un dominio de unión al antígeno se refiere a la parte de una unidad de unión al antígeno o un anticuerpo que se une al antígeno. Los dominios funcionalmente definidos no necesitan ser codificados por secuencias de aminoácidos contiguas. Los dominios funcionalmente definidos pueden contener uno o más dominios físicamente definidos. Los receptores se dividen, por ejemplo, en general, en el dominio de unión al ligando extracelular, un dominio transmembranario y un dominio efector intracelular. Un "dominio de anclaje a la membrana" se refiere a la porción de una proteína que media en la asociación a la membrana. En general, el dominio de anclaje a la membrana está compuesto por restos de aminoácidos hidrófobos. Alternativamente, el dominio de anclaje a la membrana puede contener aminoácidos modificados, por ejemplo, aminoácidos que están fijados a una cadena de ácido graso, que a su vez ancla la proteína a una membrana.

Un "ligando" es una molécula capaz de ser unida por un dominio particular (es decir, un "dominio de unión a ligando"). Los ligandos adecuados pueden ser químicamente sintetizados usando cualquier método usado en la técnica o pueden ocurrir en la naturaleza. Un "dominio de unión a ligando" es un dominio cuya acción depende de la presencia

de ligando unido. En algunos casos, la "unión del ligando" a una proteína receptora altera la conformación química afectando la orientación de la forma tridimensional. La tasa de unión de un ligando al dominio de unión a ligando se conoce como su afinidad.

Como se usa en el presente documento, "alta afinidad" se refiere a la unión del ligando resultante de mayor fuerza intermolecular entre el ligando y su receptor. Así, la unión de alta afinidad implica un mayor tiempo de residencia para el ligando en su sitio de unión al receptor, y la unión del ligando de alta afinidad implica que una concentración relativamente baja de un ligando es suficiente para ocupar de forma máxima un sitio de unión al ligando y desencadenar una respuesta fisiológica.

Los "receptores heterodiméricos" son proteínas celulares, que contienen dos subunidades proteináceas cada una de las cuales presenta afinidad de unión a un ligando. Las dos subunidades proteináceas son moléculas distintas que se diferencian en la secuencia de aminoácidos en al menos un resto de aminoácido.

Como se usa en el presente documento, un "dímero" es un complejo macromolecular formado por dos macromoléculas no covalentemente unidas, tales como proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Un "homodímero" se forma por dos moléculas idénticas en un proceso denominado "homodimerización". Un "heterodímero" se forma por dos macromoléculas diferentes en un proceso denominado "heterodimerización". Un "dominio de dimerización" se refiere a la parte de la molécula que media en la asociación de macromoléculas.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" y similares se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal, cíclico o ramificado, puede contener aminoácidos modificados, y/o se puede interrumpir por no aminoácidos. Estos términos también engloban polímeros de aminoácidos que han sido modificados, por ejemplo, por sulfatación, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, yodación, metilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación, ubiquitinación, o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente de marcado.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y ambos de los isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

"Péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido corto, por ejemplo, uno que normalmente contiene menos de aproximadamente 50 aminoácidos y más normalmente menos de aproximadamente 30 aminoácidos. El término también engloba análogos y miméticos que imitan la función estructural y, así, biológica.

El término "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido que contiene un polipéptido o fragmento acoplado a secuencias de aminoácidos heterólogos.

Los términos "polinucleótido", "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos" y similares se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud. El término incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico o sintético) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm o ARN sintético), así como análogos de ADN o ARN que contiene análogos de nucleótidos no naturales, enlaces internucleosídicos no nativos, o ambos. El ácido nucleico puede estar en cualquier conformación topológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener una conformación monocatenaria, bicatenaria, de cadena triple, cuádruple, parcialmente bicatenaria, ramificada, en forma de horquilla, circular, o en una conformación cerrada con candado.

Una "secuencia codificante" o "marco de lectura abierto" es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido o proteína. Los extremos de la secuencia codificante son un codón de iniciación y un codón de terminación.

Una "célula hospedadora" o "línea celular" o "cultivo celular" o "célula" indica células bacterianas, de planta, insecto o eucariotas superiores cultivadas o mantenidas *in vitro*. Los descendientes de una célula pueden no ser completamente idénticos (ya sea morfológicamente, genotípicamente o fenotípicamente) a la célula parental.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en producir una proteína. Incluye regiones que preceden y que siguen a la región codificante (delantera y trasera), así como secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). La delantera, la trasera, así como los intrones incluyen elementos reguladores que son necesarios durante la transcripción y la traducción de un gen. Además, un "producto génico de proteína" es una proteína expresada a partir de un gen particular.

La palabra "expresión" o "expresado", como se usa en el presente documento, en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de ADN (por ejemplo, un gen) significa el producto transcripcional y/o traduccional de esa secuencia. El nivel de expresión de una molécula de ADN en una célula se puede determinar basándose en cualquiera de la cantidad de ARNm correspondiente que está presente dentro de la célula o la cantidad de proteína codificada por ese ADN producido por la célula (véase Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18,1-18,88 (1989)). Cuando se usa en referencia a los polipéptidos, la expresión incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido que incluye, pero no se limita a, la transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación

postraduccional y secreción. La expresión se puede detectar usando técnicas convencionales para detectar proteína (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, citometría de flujo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, etc.).

El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción del polinucleótido o secuencia de polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica o resto de aminoácido ocurre en ambas secuencias dando el número de posiciones equiparadas, dividiendo el número de posiciones equiparadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 dando el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o "porcentaje "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, 60 % de identidad, opcionalmente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad a lo largo de una región especificada, por ejemplo, de las secuencias de polipéptidos completas de la divulgación o dominios individuales de los polipéptidos de la divulgación), cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación, o región designada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Entonces se dice que dichas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud o más preferentemente a lo largo de una región que tiene 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, "bacteriófago" se refiere a un virus que infecta bacterias. Similarmente, "arqueófago" se refiere a un virus que infecta arqueas. El término "fago" se usa en el presente documento para referirse a ambos tipos de virus, pero, en ciertos casos, como se indica por el contexto, también se puede usar como clave para referirse a un bacteriófago o arqueófago específicamente. Bacteriófago y arqueófago son parásitos intracelulares estrictos (con respecto a tanto la etapa de identificar una célula hospedadora a infectar como a solo ser capaces de duplicar productivamente su genoma en una célula hospedadora apropiada) que infectan y se multiplican dentro de bacterias/arqueas haciendo uso de alguna o toda la maquinaria biosintética del hospedador. Aunque diferentes bacteriófagos y arqueófagos pueden contener diferentes materiales, todos contienen ácidos nucleicos y proteínas, y en ciertas circunstancias, se pueden encapsular en una membrana lipídica.

Dependiendo del fago, el ácido nucleico puede ser o ADN o ARN (pero normalmente no ambos) y pueden existir en diversas formas, con el tamaño del ácido nucleico dependiendo del fago. El fago más simple solo tiene genomas de algunos miles de nucleótidos de tamaño, mientras que los fagos más complejos tienen más de 100.000 nucleótidos en su genoma, y, en casos raros, más de 1.000.000. Además, los fagos se pueden cubrir por una membrana lipídica y también pueden contener diferentes materiales. El número de diferentes tipos de proteína y la cantidad de cada tipo de proteína en la partícula de fago variará dependiendo del fago. Las proteínas protegen al ácido nucleico de las nucleasas en el entorno y son funcionales en la infección.

Se han secuenciado muchos genomas de fago filamentosos y no filamentosos, que incluyen, por ejemplo, los fagos filamentosos M13, f1, fd, Ifl, Ike, Xf, Pfl y Pf3. Dentro de la clase de fagos filamentosos, M13 es la especie mejor caracterizada, ya que se conoce su estructura tridimensional y las funciones de sus proteínas de la cubierta son bien entendidas. Específicamente, el genoma de M13 codifica cinco proteínas de la cubierta pIII, VIII, VI, VII y IX, que se usan como sitios para la inserción de ADN foráneo en los vectores M13.

Como se usa en el presente documento, un "genoma de fago" incluye genomas de fago que existen de forma natural y derivados de los mismos. En general (aunque no necesariamente), los derivados poseen la capacidad de propagarse en los mismos hospedadores que el progenitor. En algunos aspectos, la única diferencia entre un genoma de fago que existe de forma natural y un genoma de fago derivado es la adición o la delección de al menos un nucleótido de al menos un extremo del genoma de fago (si el genoma es lineal) o a lo largo de al menos un punto en el genoma (si el genoma es circular).

Como se usa en el presente documento, una "célula hospedadora de fago" o "célula hospedadora", o similar, es una célula que puede formar un fago a partir de un tipo particular de ADN genómico de fago. En algunos aspectos, el ADN genómico de fago se introduce en la célula por infección de la célula por un fago. El fago se une a una molécula receptora sobre el exterior de la célula hospedadora e inyecta su ADN genómico en la célula hospedadora. En algunos aspectos, el ADN genómico de fago se introduce en la célula usando transformación o cualquier otra técnica adecuada. En algunos aspectos, el ADN genómico de fago es sustancialmente puro cuando se introduce en la célula. El ADN genómico de fago puede estar presente en un vector cuando se introduce en la célula. A modo de ejemplo no limitante, el ADN genómico de fago está presente en un cromosoma de levadura artificial (YAC) que se introduce en la célula hospedadora de fago por transformación o una técnica equivalente. Entonces se copia el ADN genómico de fago y se encapsula en una partícula de fago después de la lisis de la célula hospedadora del fago.

Como se usa en el presente documento, "secuencias de la superficie externa" se refieren a secuencias de nucleótidos que codifican "proteínas de la superficie externa" de una encapsidación genética. Estas proteínas forman una cubierta proteinácea que encapsula el genoma de la encapsidación genética. Normalmente, las proteínas de la superficie externa dirigen la encapsidación para ensamblar el polipéptido a ser presentado sobre la superficie externa de la encapsidación genética, por ejemplo, un fago o bacteria.

Se requiere la "proteína de la cubierta menor del gen 3 (P3)" (una proteína de fago de la superficie externa) para la liberación del ensamblaje de bacteriófago filamentosos en la membrana del hospedador y posteriormente para el reconocimiento y la infección de un nuevo hospedador. P3 contiene al menos tres dominios distintos: dos dominios del extremo N que median en el reconocimiento y la infección del hospedador, y un dominio del extremo C (P3-C) que se requiere para la liberación de la célula hospedadora después del ensamblaje del fago y contribuye a la estabilidad estructural de la partícula de fago.

Como se usa en el presente documento, el término "fagémido" se refiere a un plásmido que contiene un origen f1 de replicación (ori) de un fago f1 (véase Analysis of Genes and Genomes, John Wiley & Sons, S. 140 (2004)). Se pueden usar fagémidos como un tipo de vector de clonación en combinación con el fago M13 filamentosos, se pueden replicar como un plásmido, y también se pueden encapsidar como ADN monocatenario en partículas virales. Los fagémidos pueden contener un ori para la replicación bicatenaria, así como un ori f1 para permitir la replicación monocatenaria y encapsidar en partículas de fago.

Un "sistema de fagémido" requiere la fusión de una secuencia de ácidos nucleicos exógena con al menos parte de una secuencia de la superficie externa del fago (por ejemplo, la secuencia de la cubierta). De esta forma, después de la infección en una célula hospedadora adecuada, la secuencia exógena se puede expresar sobre la superficie del fago. Normalmente, las secuencias de la superficie externa del fago más comúnmente usadas están dentro de los genes III y VIII del bacteriófago M13, aunque también se pueden usar fusiones de los genes VI, VII y IX.

Como se usa en el presente documento, "el fago auxiliar" se refiere a un vector que contiene secuencias codificantes para las proteínas necesarias para la encapsidación del fago.

Sistemas de presentación doble

En el presente documento se proporcionan sistemas de presentación que permiten la robusta presentación de dos polipéptidos de unión a ligando diferentes (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) sobre la superficie de un fago (es decir, un bacteriófago filamentosos). Cuando se expresan en una célula hospedadora adecuada, los dos polipéptidos tienen una geometría y/o una distancia de separación molecular que se parece a la de los dos sitios de unión al antígeno en una molécula de inmunoglobulina intacta. Estos sistemas se pueden usar en métodos de identificación de anticuerpos biospecíficos capaces de unirse específicamente a moléculas diana de elección.

Los sistemas de presentación descritos en el presente documento incluyen tres componentes separados: (1) un fagémido que codifica un primer polipéptido de unión a ligando fusionado en marco con un primer dominio de dimerización y una proteína de la superficie externa del fago; (2) un plásmido que codifica un segundo polipéptido de unión a ligando fusionado en marco con un segundo dominio de dimerización; y (3) un fago auxiliar que codifica todas las proteínas necesarias para encapsidar el fago. En estos sistemas, el primer y el segundo polipéptidos de unión a ligando son diferentes y se unen entre sí a un ligando diana diferente.

Estos sistemas utilizan pares relacionados de cremalleras de leucina que se heterodimerizan preferentemente entre sí y solo se homodimerizan con baja afinidad (si alguna). Los ejemplos no limitantes de dichas cremalleras de leucina incluyen los dominios VBP manipulados de BZIP1 y BZIP2 (véase Moll et al., Protein Science 10:646-655 (2001)) y los dominios de receptor 1 y 2 de GABA_B que existen de forma natural (véase Wang et al., PLOS ONE 6(4): e19023 (2011)). Las secuencias de estas cremalleras de leucina se proporcionan a continuación:

BZIP-1

CTGGAAATTCGCGCGGCGTTTCTGCGCCAGCGCAACACCGCGCTGCCACCGAAGT
GGCGGAAGTGGAAACAGGAAGTGCAGCGCCTGAAAACGAAGTGAGCCAGTATGAA
ACCGCTATGGCCCGCTGGGCGGCGGCAAA (SEQ ID NO: 1)

LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLNEVSQYETRYGPLGGGK (SEQ ID NO: 2)

BZIP-2

CTGGAAATTGAAGCGGCGTTTCTGGAACGCGAAAACACCGCGCTGGAAACCCGCGT
GGCGGAACTGCGCCAGCGCGTGCAGCGCTGCGCAACCGCGTGAGCCAGTATCGCA
CCCGCTATGGCCCGCTGGGCGGCGGCAAA (SEQ ID NO: 3)

LEIEAAFLERENTALETRVAELRQVRVQRLNRVSQYRTRYGPLGGGK (SEQ ID NO: 4)

GABA-R1

GAAGAAAAAGCCGCCTGCTGGAAAAAGAAAACCGCGAACTGGAAAAAATTATTG
CGGAAAAAGAAGAACGCGTGAGCGAACTGCGCCATCAGCTGCAGAGC (SEQ ID NO:
5)

EEKSRILLEKENRELEKIIAEKEERVSELRHQLQS (SEQ ID NO: 6)

5

GABA-R2

ACCAGCCGCCTGGAAGGCCTGCAGAGCGAAAACCATCGCCTGCGCATGAAAATTAC
CGAACTGGATAAAGATCTGGAAGAAGTGACCATGCAGCTGCAGGAT (SEQ ID NO: 7)

TSRLEGLQSENHRLRMKITELDKDLEEVMTQLQD (SEQ ID NO: 8)

Después de la expresión en una célula hospedadora adecuada, las fusiones de los dos polipéptidos de unión a ligando se asocian por sus dominios de dimerización respectivos, dando, así como resultado la presentación simultánea de los dos polipéptidos de unión a ligando en la superficie del fago. La fusión del primer y el segundo dominios de unión a ligando en marco con uno de los pares relacionados de cremalleras de leucina asegura que, después de la expresión en una célula hospedadora adecuada, una copia de cada uno de los polipéptidos de unión a ligando se exprese sobre la superficie del fago.

Estos sistemas también se pueden usar para presentar dos polipéptidos de unión a ligando diferentes sobre la superficie de un fago que provoca que el sistema de presentación se transcriba y traduzca en una célula hospedadora adecuada (por ejemplo, usando cualquier método comúnmente empleado en la técnica).

También se proporcionan métodos de detección de una interacción específica simultánea entre uno o más agentes de prueba y dos polipéptidos de unión a ligando presentados sobre la superficie de un fago. En dichos métodos, el fago se pone en contacto con el agente de prueba en condiciones adecuadas para producir un complejo estable entre los polipéptidos de unión a ligando y el uno o más agentes de prueba. En diversas realizaciones, el uno o más agentes de prueba son antígeno o un ligando (por ejemplo, proteína, un polisacárido y/o un lípido).

Por consiguiente, estos sistemas de presentación tienen la posibilidad de aplicarse a la identificación de pares de ligandos capaces de acoplar simultáneamente dos dianas definidas por el usuario diferentes, que facilitaría a su vez el descubrimiento de novedosos anticuerpos biespecíficos.

Construcción de un sistema de replicón doble basado en dominios de heterodimerización de cremallera de leucina

Para la presentación de dos scFv diferentes en proximidad en la superficie del fago, se usa un sistema basado en un par de dominios de cremallera de leucina (véase Moll et al., Protein Sci 10:649-655(2001)) que caracterizan restos cargados complementarios para inhibir la homodimerización por repulsión electrostática y favorecer la heterodimerización por atracción electrostática (véase la Figura 1A, Z1 y Z2).

En este sistema, se inserta un dominio de cremallera de leucina entre un primer fragmento scFv y la proteína de cubierta menor del fago pIII sobre un vector de fagémido (pNDS-DD) de manera que tanto el gen como su producto se incorporen en partículas de fago durante el rescate (denominado posteriormente el "componente de fago") (Figura 8). El otro dominio de cremallera de leucina se añade a un segundo fragmento scFv que está codificado para la expresión como una proteína periplásmica soluble (denominada posteriormente el "componente soluble") sobre un vector de expresión complementario (pCDF-1b-DD) (Figuras 9A, 9B, 10A y 10B).

Durante el ensamblaje y la extrusión de fagos, el componente soluble forma un complejo mediado por cremallera de leucina estable con el componente de fago en el periplasma bacteriano dando como resultado partículas de fago que presentan dos fragmentos de anticuerpos diferentes: el componente de fago scFv codificado sobre el vector de fagémido encapsidado más el componente soluble scFv codificado sobre el plásmido alojado por el hospedador bacteriano en el que se realiza el rescate del fago (véase la Figura 1B).

La asociación del anticuerpo de componente soluble durante el ensamblaje de fago depende de la heterodimerización de la cremallera de leucina (véase la Figura 2), que conduce a la selección de clones de fagos raros competentes en la heterodimerización (es decir, presentes en 1 de cada 10^5 en la población inicial) en varias rondas de inmunopurificación contra la diana del anticuerpo de componente soluble (véase la Figura 3 y la Tabla 1).

- 5 Tabla 1. La adquisición por fago de presentación doble del anticuerpo de componente soluble es suficiente para conducir la selección durante varias rondas de inmunopurificación y amplificación.

		Inmunopurificación en el péptido CD3		Sin inmunopurificación	
Frecuencia según la secuenciación de colonias		Z1	Z2	Z1	Z2
relación inicial (Z2:Z1) 1:10	R1	0/16	16/16	19/21	2/21
	R2	0/18	18/18	11/15	4/15
	R3	0/17	17/17	11/16	5/16
relación inicial (Z2:Z1) 1:1000	R1	5/6	1/6	18/18	0/18
	R2	2/24	22/24	13/13	0/13
	R3	0/19	19/19	22/22	0/22
relación inicial (Z2:Z1) 1:100000	R1	12/12	0/12	10/10	0/10
	R2	7/14	7/14	23/23	0/23
	R3	1/23	22/23	18/18	0/18

Caracterización de fago de presentación doble

- 10 Se usaron tres fragmentos de anticuerpos de especificidad conocida para probar la factibilidad de la presentación doble: péptido anti-CXCL10 (véase Fagete et al., 1:288-296 (2009)), anti-interferón gamma (anti-IFN γ) (véase Ravn, et al., 2010) y anti-CD3 (véase el documento de patente WO2011/121110). En un primer experimento, se usaron cuatro construcciones de fagémido pNDS-DD que codificaban anti-IFN γ -Z1, anti-IFN γ -Z2, anti-CXCL10-Z1 o anti-CXCL10-Z2 para la expresión de componentes de fago. Estos fagémidos se rescataron en *E. coli* que alojaba plásmidos pCDF-1b-DD que codificaban o anti-CD3-Z1 o anti-CD3-Z2 como componentes solubles. Se evaluaron por
- 15 ELISA las ocho mezclas de rescate de fago diferentes para su capacidad para unirse a una proteína de fusión péptido CD3 inmovilizado-Fc (véase la Figura 2).

- Y, lo que es más importante, solo se obtuvieron señales positivas de ELISA cuando el dominio de cremallera de leucina de componente soluble fue complementario al dominio de cremallera de leucina en el componente de fago (es decir, Z1 en el componente de fago, Z2 en el componente soluble, o viceversa; véase la Figura 2), confirmando que la
- 20 incorporación del fragmento soluble de anticuerpo para presentación doble es conducida por la heterodimerización de dominios de cremallera de leucina complementarios.

- Se pueden aislar clones raros (1 en 10^5) capaces de presentar dos especificidades de anticuerpo diferentes a lo largo de varias rondas de selección basadas en su capacidad para acoplar simultáneamente dos dianas definidas por el usuario (véase la Figura 4 y la Tabla 2), proporcionando así una prueba de concepto inicial importante para el sistema
- 25 de presentación doble.

Tabla 2. La selección de presentación doble enriquece los clones de fagos raros capaces de presentar dos anticuerpos relacionados diferentes

Clon de fago	Anticuerpos presentados		Proporción inicial	Colonias detectadas	
	anti-CCR5	anti-CD3		Ronda 3	Ronda 4
Anti-CCR5-Z2	+	+	1	49	21
AntiCCR5-Z1	+	-	1	0	0
Anti-IFN γ -Z2	-	+	1	2	0
Anti-IFN γ -Z1	-	-	10000	20	0

La incorporación del anticuerpo de componente soluble es suficiente para conducir la selección de fagos

Para determinar si la adquisición mediada por la cremallera de leucina del componente scFv soluble durante el ensamblaje de fagos es suficientemente robusto para conducir la selección de fagos durante ciclos de inmunopurificación contra su diana. Los fagémidos de pNDS-DD, que codifican o anti-IFN γ -Z1 o anti-IFN γ -Z2 como componente de fago, se rescataron en *E. coli* que alojaba pCDF-1b-DD que codifica el componente soluble anti-CD3-Z1. De esta forma, solo el fago anti-IFN γ -Z2 sería capaz de adquirir el scFv anti-CD3 mediante la heterodimerización de la cremallera de leucina (véase la Figura 3A). Esta mezcla de fago se sometió a rondas de inmunopurificación por selección contra la proteína de fusión péptido CD3 inmovilizado-Fc para determinar el grado al que el fago anti-IFN γ -Z2 que presenta anti-CD3 se podría enriquecer de un acervo de fago anti-IFN γ -Z1 anti-CD3 negativo. Para controlar cualquier enriquecimiento que ocurriera debido a las posibles diferencias en las ventajas de crecimiento entre fago anti-IFN γ -Z1 y anti-IFN γ -Z2, se realizó un experimento de selección paralelo en el que se realizaron rondas de infección y amplificación sin la etapa de inmunopurificación del péptido CD3.

Después de cada ronda de selección, se secuenciaron colonias individuales para cada población de fagos para determinar la proporción de fago anti-IFN γ -Z2 con respecto a anti-IFN γ -Z1 (véase la Tabla 1), y se evaluó por ELISA para unirse a la proteína de fusión péptido CD3 inmovilizado-Fc (véanse las Figuras 3B y 3C). Se mezcló fago que codifica IFN γ -Z2 con fago que codificaba IFN γ -Z1 en la relación indicada, y las mezclas se sometieron a rondas de selección como se muestra en la Figura 3A. Se recogieron las colonias correspondientes a clones de fago individuales al azar después de cada ronda de selección y se secuenciaron para determinar si correspondieron a IFN γ -Z1 o IFN γ -Z2. El fago anti-IFN γ -Z2, que es capaz de adquirir el anticuerpo de componente soluble anti-CD3-Z1 mediante la heterodimerización de la cremallera de leucina, se enriqueció eficientemente durante la inmunopurificación contra el péptido CD3 inmovilizado (véase la Tabla 1). Como era de esperar, el enriquecimiento fue acompañado por elevadas señales de ELISA anti-fago CD3 (véase la Figura 3B). No se indicaron aumentos ni en la prevalencia de la cremallera de leucina Z2 ni en la señal de ELISA anti-péptido CD3 cuando el fago se sometió a rondas de selección en ausencia de inmunopurificación (véase la Figura 3C). Por tanto, la asociación del anticuerpo de componente soluble en el sistema de presentación doble es suficientemente robusta para conducir la selección a lo largo de varias rondas de inmunopurificación.

Selección conducida por el acoplamiento conjunto de dos dianas con los dos anticuerpos presentados

Se puede accionar la selección de fago de presentación doble por acoplamiento conjunto de dos epítopes diana diferentes. Por ejemplo, se generó establemente una línea celular clonal (CHO-CD3-CCR5) que expresa un receptor de la superficie celular, CCR5, con el péptido CD3 épsilon (1-15) unido a su dominio del extremo N extracelular (véanse la Figura 4A y Figura 6A). Habiendo reformateado un anticuerpo anti-CCR5 bien caracterizado (PRO-140) (véase Trkola et al., J. Virol. 75:579-588 (2001)) como un fragmento scFv, se usó la línea celular en un experimento de selección que implicaba clones de fago que codificaban cuatro componentes de fago diferentes: anti-CCR5-Z1, anti-CCR5-Z2, anti-IFN γ -Z1 y anti-IFN γ -Z2.

Después de rescatar en *E. coli* que expresa componente soluble anti-CD3-Z1, cabría esperar que cada uno de los cuatro clones de fago presentara una combinación diferente de anticuerpos: fago anti-CCR5-Z2 con tanto anticuerpos anti-CCR5 como anti-CD3, fago anti-CCR5-Z1 con anti-CCR5 solo, fago anti-IFN γ -Z2 con anti-CD3 solo, y anti-IFN γ -Z1 con ningún anticuerpo relacionado (véase la Figura 4A). Los clones de fago relacionados (anti-CCR5-Z2, anti-CCR5-Z1 y anti-IFN γ -Z2) se diluyeron cada uno diez mil veces con respecto al clon no relacionado (anti-IFN γ -Z1) y se sometieron a rondas de inmunopurificación en células CHO-CD3-CCR5 (véase la Figura 4B).

Se llevó a cabo análisis del enriquecimiento secuenciando colonias elegidas al azar después de las rondas de selección 3 y 4 (véase la Tabla 2). Se mezclaron cuatro clones de fago diferentes capaces de presentar diferentes combinaciones de anticuerpos relacionados (véase la Figura 4A) para proporcionar las proporciones de partida indicadas. Después de la ronda 3 y la ronda 4 de selección, se eligieron colonias correspondientes a los clones de fago individuales al azar y se secuenciaron. Se indica el número de colonias identificadas como correspondientes a cada clon de fago. Como era de esperar, el clon de fago no relacionado (anti-IFN γ -Z1), que estuvo inicialmente presente en un exceso de diezmil veces, se eliminó progresivamente durante. Y, lo que es más importante, de los clones de fago que presentaron uno o más anticuerpos relacionados, solo el clon que presentó tanto anti-CD3 como anti-CCR5 (anti-CCR5-Z2) se enriqueció durante la selección: anti-CCR5-Z2 fue el único de los cuatro clones de partida que fue detectable después de la ronda 4. Por tanto, se puede usar presentación doble para enriquecer específicamente fago raro (es decir, presente en 1 de cada 10⁵ en la población inicial) capaz de presentar anticuerpos contra dos estructuras diana diferentes.

Adaptación de la presentación doble para la selección basada en bibliotecas

Se diseñó la estrategia de replicón doble descrita en el presente documento para hacer el sistema de presentación doble fácilmente susceptible a la selección basada en bibliotecas. Se pudo clonar una biblioteca de anticuerpos intactos de presentación doble de una "sola etapa" en el fagémido pNDS-DD y luego usar con diferentes anticuerpos de componente soluble definidos por el usuario: requiriendo una nueva cepa bacteriana que aloje el fragmento de anticuerpo de componente soluble de elección a generar, infectado por la biblioteca de anticuerpos intactos de presentación doble y luego se somete a rescate por fago auxiliar.

Adaptación de la selección simultánea de pares de ligandos funcionales

En una realización, donde el usuario debe fijar una especificidad de anticuerpo diana (el componente soluble) antes de cada experimento de selección, no es posible el cribado combinatorio para buscar pares novedosos de anticuerpos compatibles. Sin embargo, este sistema se podría adaptar para permitir la selección directa de pares funcionales de anticuerpos, haciendo uso del sistema de infección combinatoria / recombinación *in vivo* de LoxP/Cre (véase Waterhouse et al., Nucleic Acids Res. 21:2265-2266 (1993)). En este proceso, las bacterias se transforman con una biblioteca de plásmidos donantes, y entonces se infectan con fago capaz de adquirir secuencias del plásmido donante por recombinación. Se podrían generar bibliotecas de fagémidos de presentación doble combinatoria que codificaran tanto anticuerpos de componente soluble como de fago adaptando los vectores pNDS-DD y pCDF-1b-DD para incluir sitios de recombinación flanqueantes apropiados.

Por consiguiente, se podría usar cualquiera de los sistemas y métodos descritos en el presente documento para el aislamiento directo de pares de anticuerpos capaces de acoplar simultáneamente dos marcadores superficiales celulares diferentes (por ejemplo, sobre células tumorales) para aumentar la especificidad de células diana. Adicionalmente (o alternativamente), se podrían usar pares de anticuerpos capaces de inducir la heterodimerización de dos receptores de célula diana diferentes para ajustar la modulación de la actividad de señalización celular.

Ejemplos**Ejemplo 1: Presentación doble de anticuerpos: un método de optimización del descubrimiento de anticuerpos biespecíficos***Plásmidos, fagémidos, fago auxiliar y cepas bacterianas*

Se compraron los plásmidos pcDNA3.1 y pCDF-1b de Invitrogen y Novagen, respectivamente. El vector de fagémido pNDS se ha descrito previamente (véase Venet et al., PLoS One 7:e43471 (2012)). Se produjeron internamente el fago auxiliar M13KO7 (véase Vieira et al., Methods Enzymol. 153:3-11(1987)) y TG1 de E. coli (K-12 supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (r_Km_K) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]). Se compró XL1-Blue de E. coli (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac) de Agilent Technologies.

Anticuerpos, líneas celulares y materiales

Anticuerpos. Se aislaron anticuerpos anti-CXCL10 humano (véase Fagete et al., 1:288-296(2009)) y anti-IFN γ humano (véase Ravn et al., Nucleic Acids Res. 38:e193(2010)) de bibliotecas de presentación en fagos de scFv intactos usando selección habitual por presentación en fagos y procedimientos de cribado. Se sintetizaron (Eurofins) los genes que codifican los dominios VH y VL de anticuerpos previamente descritos dirigidos contra CCR5 humano (véase Trkola et al., J. Virol. 75:579-588(2001)) y los restos 1-15 de la forma madura de la subunidad CD3 épsilon humana (véase el documento de patente WO2011/121110) y se ensamblaron como fragmentos scFv.

Células CHO-CD3-CCR5. Se clonó una construcción de fusión que codificaba CCR5 humano precedido por la secuencia conductora de prolactina humana y 1-15 de la forma madura de la subunidad CD3 épsilon humana en el vector de expresión en células de mamífero pcDNA3.1. Se usó el plásmido resultante para transfectar células de ovario de hámster chino (CHO), que luego se amplificaron en presencia del antibiótico de selección G418 (Invitrogen, 1,2 mg/mL). Se aislaron clones individuales por citometría de flujo seguido por expansión adicional, eligiéndose un único clon basándose en el análisis de citometría de flujo de la expresión superficial de tanto CCR5 como el epítope del péptido de subunidad CD3 épsilon.

Construcción de vector de expresión. Se ensambló el gen que codificaba la proteína madura CCR5 humana (referencia de NCBI NM_000579) por extensión por PCR con el añadido del extremo N (i) la secuencia conductora precursora de prolactina bovina (referencia de NCBI NM_173953), (ii) restos 1-15 de la subunidad CD3 épsilon humana madura (referencia de NCBI NM_000733.3) (véase la Figura 5 a continuación). El fragmento resultante se clonó en el vector de expresión en células de mamífero pcDNA3.1 (Invitrogen) usando sitios de restricción XbaI y NotI.

Péptido CD3-Fc biotinilado. Se usó extensión por PCR para fusionar la secuencia que codifica los restos 1-15 de CD3 épsilon humano con el extremo N de la región Fc γ 1 humana e incorporar una secuencia AviTagTM de extremo C (Avidity). Este fragmento se clonó en el vector de expresión de mamífero Peak8 (Edge Biosystems) usando sitios HindIII y EcoRI, y la proteína de fusión se expresó como se describe previamente (véase Magistrelli et al., Protein Expr. Purif. 72:209-216(2010)). Después de 10 días de producción en un biorreactor celular (Integra), la proteína recogida se purificó sobre una columna de proteína G Sepharose (GE healthcare) usando un sistema de cromatografía ÄKTA Prime (Amersham Pharmacia Biotech). La proteína purificada se biotiniló *in vitro* usando la enzima BirA (Avidity) según las instrucciones del fabricante, se desaló usando una columna PD10 (GE healthcare) y se verificó para pureza e integridad por SDS-PAGE.

Clonación molecular del sistema de replicón doble

Fagémido de presentación doble (pNDS-DD). Se modificó el fagémido pNDS usando una estrategia de clonación QuikChange (Agilent Technologies) para introducir sitios *SpeI* y *PacI* en marco con la secuencia codificante del gen 3 de fago y retirar el codón ámbar. Entonces se usaron los sitios *SpeI* y *PacI* para insertar fragmentos correspondientes a secuencias codificantes optimizadas en los codones de *E. coli* correspondientes a dominios de la cremallera de leucina Z1 y Z2 (véase Moll et al., Protein Sci 10:649-655(2001)) y flanqueadas por espaciadores ricos en glicina/serina. Entonces se clonaron fragmentos scFv de anticuerpo en fagémidos de presentación doble usando los sitios *SfiI* y *NotI* habituales en el esqueleto del fagémido.

Generación y caracterización de línea celular clonal establemente transfectada. Se transfectó el plásmido resultante en células de ovario de hámster chino usando Lipofectamine™ (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron células establemente transfectadas por cultivo en presencia de 1,2 mg/mL de geneticina (ThermoFisher), y se aislaron clones individuales por citometría de flujo. Se evaluaron las líneas celulares clonales por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-CCR5 (mAb HEK/1/85a directamente conjugado con Alexa Fluor 488, BioLegend) y se usó un anticuerpo anti-péptido CD3 (véase Pande et al., 28:849-858(2010)) (ensamblado para la expresión como una inmunoglobulina humana intacta) con anticuerpo secundario Fc anti-humano de ratón conjugado con ficoeritrina (clon H2, Southern Biotech).

Plásmido para la expresión de componentes solubles (pCDF-1b-DD). Se insertó un sitio de restricción *SphI* en la dirección 5' del sitio de clonación múltiple de pCDF-1b usando mutagénesis QuikChange (Agilent Technologies). Se usó este sitio, junto con el sitio *PacI* en el esqueleto del plásmido, para insertar fragmentos *SphI*-*PacI* de vectores de fagémido de donante correspondientes a las proteínas de fusión codificadas de scFv-cremallera de leucina. Se muestran en las Figuras 7A y 7B las etapas realizadas para modificar el fagémido de partida, pNDS, para generar el fagémido final, pNDS-DD.

Rescate de fagos

Se rescataron los fagémidos pNDS-DD introducidos en plásmidos pCDF-1b-DD que alojan TG1 de *E. coli* usando el fago auxiliar M13KO7 según procedimientos convencionales (véase Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. (1991) 19, 4133-4137), excepto que se usó espectinomicina (30 µg/mL), el antibiótico de selección en el plásmido pCDF-1b-DD, además de ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Se precipitó dos veces el fago rescatado incubando el sobrenadante de rescate durante 2 h a 4 °C con un volumen de polietilenglicol 8000 (20 % (p/v), Acros Organics) / disolución 2,5 M de NaCl correspondiente a 30 % del volumen de sobrenadante de rescate. Entonces se resuspendieron los precipitados en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) complementado con EDTA 1 mM (tampón Tris-EDTA).

ELISA de fagos

Se recubrieron placas Maxisorp (Nunc) (4 °C, durante la noche) con 1 µg/mL de estreptavidina (Roche), luego se lavaron con PBS complementado con 0,05 % de Tween 20 (PBS-Tween 0,05 %) y se bloquearon con PBS complementado con 3 % (p/v) de leche en polvo (Sigma) (PBS-leche). Entonces se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 h con péptido CD3-Fc biotinilado (1 µg/mL), luego se lavaron con PBS-Tween 0,05 % y se incubaron (temperatura ambiente, 1 h) con fago rescatado suspenso en PBS-leche. Después de lavar con PBS-Tween 0,05 %, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:5000, Amersham). Las placas se lavaron otra vez con PBS-Tween 0,05 % y se revelaron usando sustrato TMB (Sigma-Aldrich), deteniéndose la reacción después de 20 min con H₂SO₄ 1 M antes de la medición de la absorbancia a 450 nm.

Selección por inmunopurificación contra el péptido CD3 inmovilizado

Se suspendieron mezclas de fagos (10¹² ufc) en 1 mL de PBS-leche y se pre-adsorbieron (temperatura ambiente, 1 h) sobre perlas magnéticas de estreptavidina (Dynal M-280). Se bloqueó un lote separado de perlas magnéticas de estreptavidina (100 µL) con PBS-leche durante 1 h a temperatura ambiente y se recubrieron con péptido CD3-Fc biotinilado (100 nM, temperatura ambiente, 1 h). Entonces se lavaron las perlas primero con 1 mL de PBS complementado con 0,1 % de Tween 20 (PBS-Tween 0,1 %), luego con 1 mL de PBS y finalmente con 1 mL de PBS-leche antes de la incubación (temperatura ambiente, 2 h) con el fago previamente adsorbido. Entonces se lavaron las perlas con PBS-Tween 0,1 % (cinco veces) seguido por PBS (dos veces) y luego se incubaron durante una hora a 37 °C con TG1 de *E. coli* de crecimiento exponencial. Entonces se extendió el cultivo bacteriano sobre placas que contenían 2xTY complementado con ampicilina y glucosa.

Selecciones de acoplamiento conjunto

Este procedimiento se muestra representado esquemáticamente en la Fig. 4B.

Bloqueo de fagos. Se bloquearon mezclas de fagos (aproximadamente 10¹¹ ufc para la primera ronda, luego 10⁹-10¹⁰ ufc para rondas posteriores) en 300 µL de PBS complementado con albúmina de suero bovino (3 % (p/v) Sigma) a temperatura ambiente durante 1 h en un agitador rotatorio (20 rpm).

Pre-adsorción sobre células CHO no transfectadas. Se usó la mezcla de fagos bloqueados para resuspender 10^7 células CHO no transfectadas, manteniéndose la suspensión resultante sobre hielo durante 1 h. Entonces se centrifugó la suspensión a 300 g (4 °C, 3 min), y se recuperó el sobrenadante que contenía el fago sin células.

- 5 *Incubación con células CHO-CD3-CCR5.* Se usó el sobrenadante recuperado para resuspender 10^7 células CHO CCR5-CD3, incubándose la suspensión resultante a 4 °C durante 2 h en un agitador rotatorio (10 rpm), luego se lavó con 1 mL de PBS-Tween 0,05 % helado (cuatro veces) seguido por 1 mL de PBS helado (dos veces).

- 10 *Elución a bajo pH.* Se centrifugó la suspensión de células a 300 g (4 °C, 3 min), luego se resuspendió en 500 µL de tampón glicina HCl (0,2 M pH 2,2) y se dejó durante 10 min sobre hielo antes de la neutralización con tampón Tris-EDTA. Se centrifugó nuevamente (300 g, 4 °C, 3 min), con tanto el sobrenadante que contenía fago eluido con ácido como el sedimento de células recuperado por separado.

- 15 *Elución de lisis celular e infección de E. coli.* Se resuspendieron células sedimentadas en 500 µL de Tris-EDTA y se lisaron usando tres ciclos rápidos de congelación-descongelación. Los lisados, bien combinados con las eluciones de ácido (rondas de selección 2 a 4) o usados solos (ronda 1), se añadieron a 10 mL de células TG1 de *E. coli* de crecimiento exponencial y se incubaron a 37 °C, durante 1 h. El cultivo bacteriano resultante se extendió sobre placas que contenían 2xTY complementado con ampicilina y glucosa.

Secuenciación de colonias de fagos individuales

- 20 Después de cada ronda de selección, se eligieron colonias de TG1 de *E. coli* únicas que alojaban clones de fagos individuales y se cultivaron durante la noche en caldo LB complementado con ampicilina y glucosa. Se prepararon minipreparaciones de plásmidos y se usaron para la secuenciación de insertos (Microsynth). Se usó el análisis de las secuencias resultantes para determinar tanto scFv como el dominio de cremallera de leucina codificado en cada clon de fagémido.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de presentación para presentar simultáneamente dos polipéptidos de unión a ligando en la superficie de un fago, que comprende:
 - a. un fagémido que comprende la secuencia codificante de un primer polipéptido de unión a ligando fusionado en marco con un primer dominio de dimerización y con una proteína de la superficie externa del fago;
 - b. un plásmido que comprende la secuencia codificante de un segundo polipéptido de unión a ligando fusionado en marco con un segundo dominio de dimerización; y
 - c. un fago auxiliar que comprende secuencias codificantes de todas las proteínas necesarias para encapsidar el fago;
- en donde el primer y el segundo polipéptidos de unión a ligando son diferentes y se unen entre sí a un ligando diana diferente, y en donde, cuando las fusiones del primer y el segundo polipéptidos de unión a ligando y todas las proteínas de fago se expresan en una célula hospedadora adecuada, las fusiones de los dos polipéptidos de unión a ligando se asocian por sus dominios de dimerización respectivos, dando como resultado la presentación simultánea de los dos polipéptidos de unión a ligando en la superficie de fago.
2. El sistema de presentación de la reivindicación 1, en donde el primer polipéptido de unión a ligando y el dominio de dimerización se fusionan con la proteína de la cubierta menor 3 de bacteriófago filamentoso.
3. El sistema de presentación de la reivindicación 1, en donde el primer dominio de dimerización se heterodimeriza con el segundo dominio de dimerización con alta afinidad.
4. El sistema de presentación de la reivindicación 3, en donde el primer dominio de dimerización y el segundo dominio de dimerización son cremalleras de leucina
5. El sistema de presentación de la reivindicación 4, en donde el primer dominio de dimerización está codificado por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 y el segundo dominio de dimerización está codificado por el ácido nucleico de SEQ ID NO: 3
6. El sistema de presentación de la reivindicación 4, en donde el primer dominio de dimerización comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y el segundo dominio de dimerización comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4
7. El sistema de presentación de la reivindicación 4, en donde el primer dominio de dimerización está codificado por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5 y el segundo dominio de dimerización está codificado por el ácido nucleico de SEQ ID NO: 7.
8. El sistema de presentación de la reivindicación 4, en donde el primer dominio de dimerización comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y el segundo dominio de dimerización comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.
9. El sistema de presentación de la reivindicación 1, en donde el primer y el segundo polipéptidos de unión a ligando son polipéptidos de unión al antígeno, opcionalmente en donde el primer y el segundo polipéptidos de unión a ligando son scFv, dominios de unión que no son de inmunoglobulina o péptidos.
10. El sistema de presentación de la reivindicación 1, en donde, cuando se expresa en la célula hospedadora, dos polipéptidos de unión a ligando presentados sobre la superficie del fago tienen una geometría y/o una distancia de separación molecular comparable a la de una molécula de IgG.
11. Un kit que comprende el sistema de presentación de la reivindicación 1 en encapsidación adecuada.
12. Un método de presentación de dos polipéptidos de unión a ligando sobre la superficie de un fago, comprendiendo el método provocar que el sistema de presentación de la reivindicación 1 se transcriba y traduzca en una célula hospedadora adecuada.
13. Un método de detección de una interacción específica simultánea entre uno o más agentes de prueba y dos polipéptidos de unión a ligando presentados sobre la superficie de un fago, comprendiendo el método;
 - a. proporcionar un fago que presenta los dos polipéptidos de unión a ligando que se preparan según el método de la reivindicación 12;
 - b. poner en contacto el fago con el uno o más agentes de prueba en condiciones adecuadas para producir un complejo estable entre los dos péptidos de unión a ligando y los agentes; y
 - c. detectar la formación del complejo estable.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el uno o más agentes de prueba se selecciona del grupo que consiste en proteína, polisacárido, lípido y combinaciones de los mismos.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el uno o más agentes de prueba son antígenos o ligandos.

Figura 1

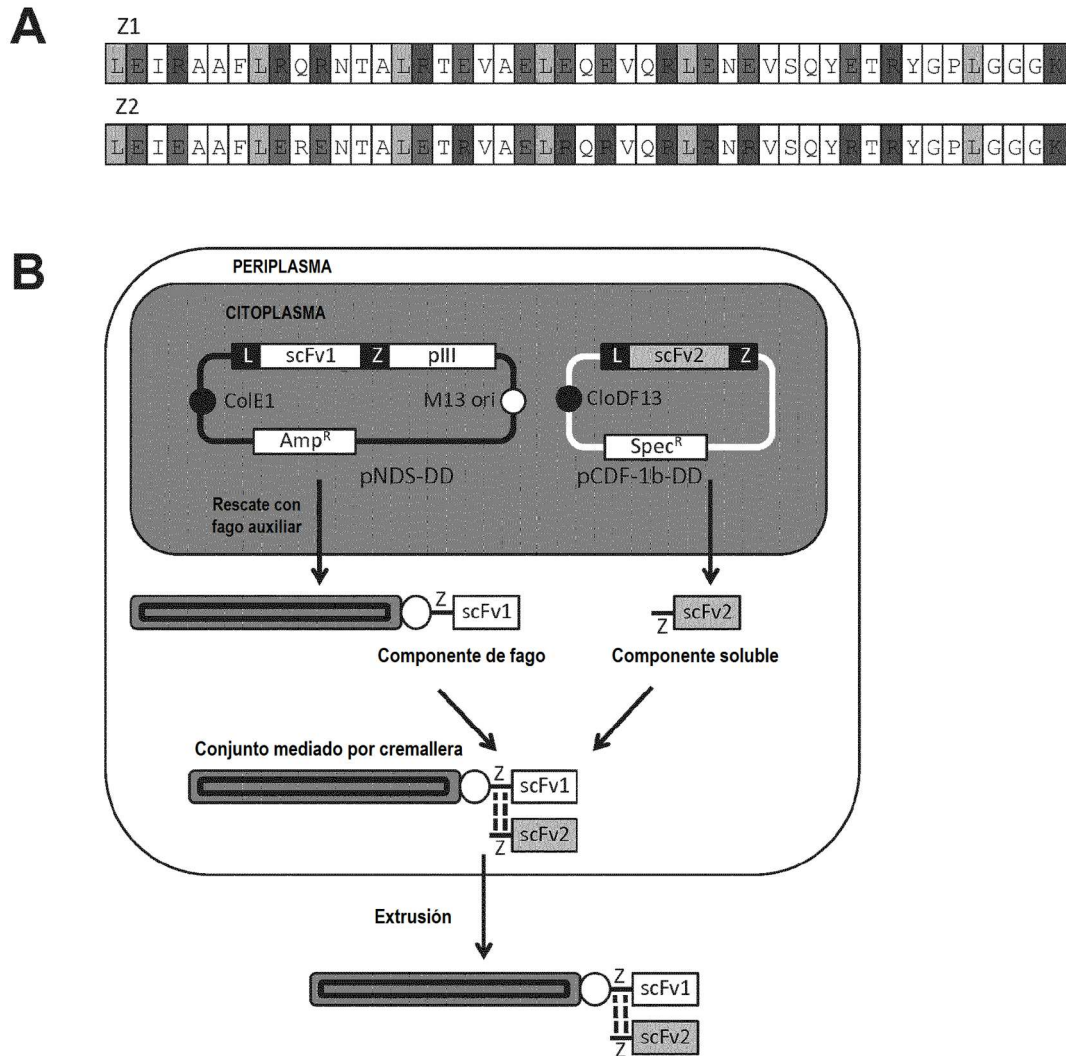


Figura 2

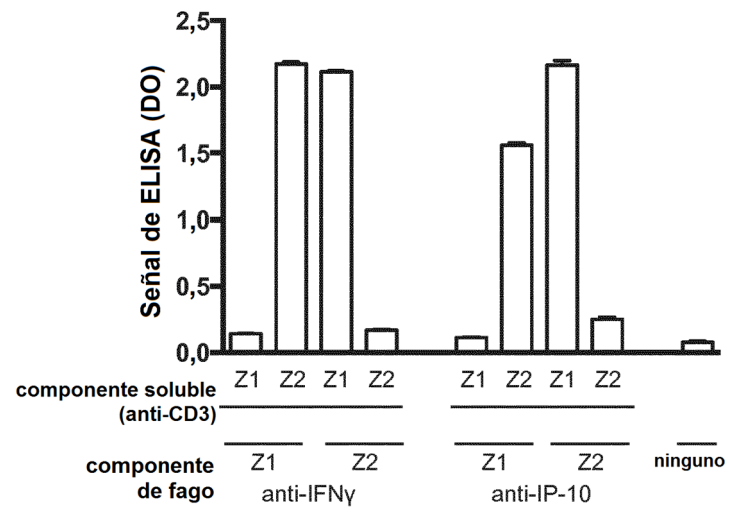


Figura 3

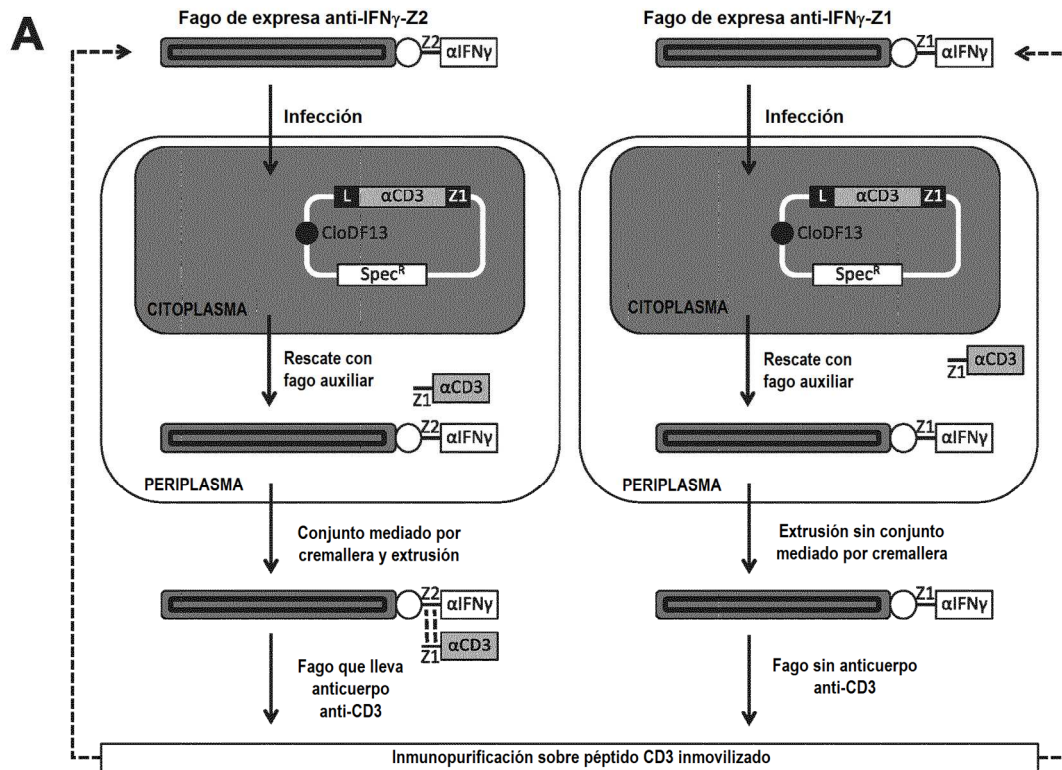


Figura 3B

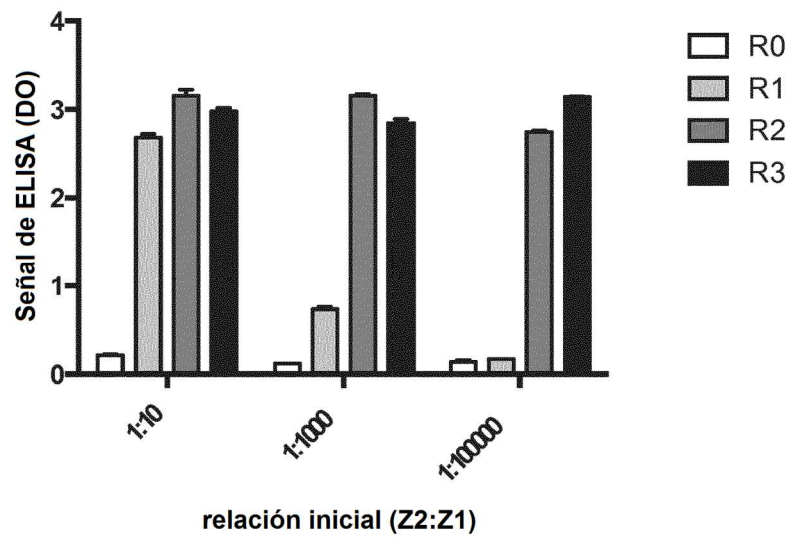


Figura 3C

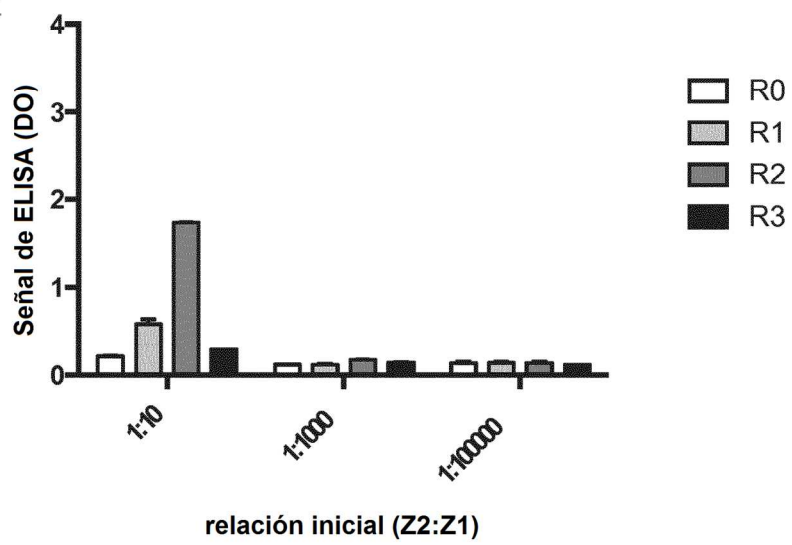


Figura 4A

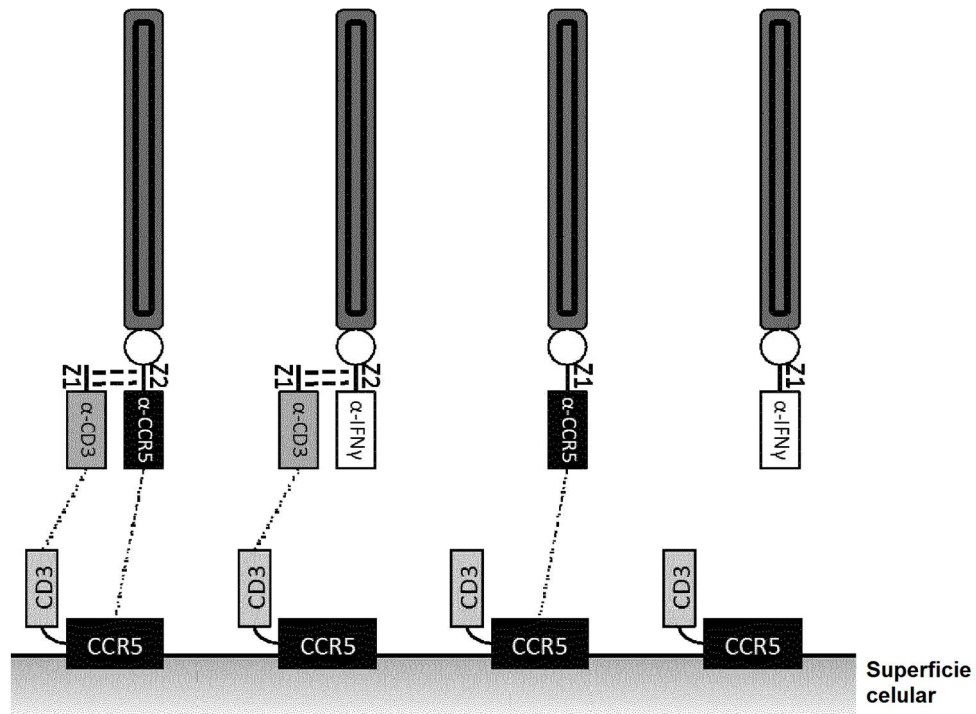


Figura 4B

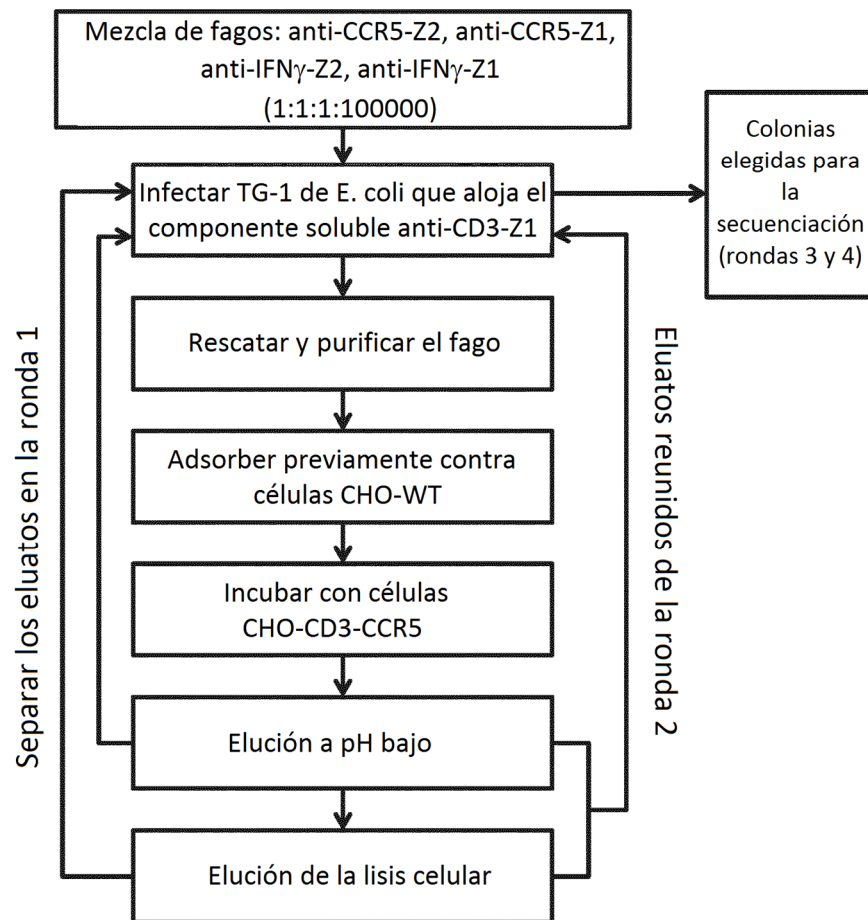


Figura 5

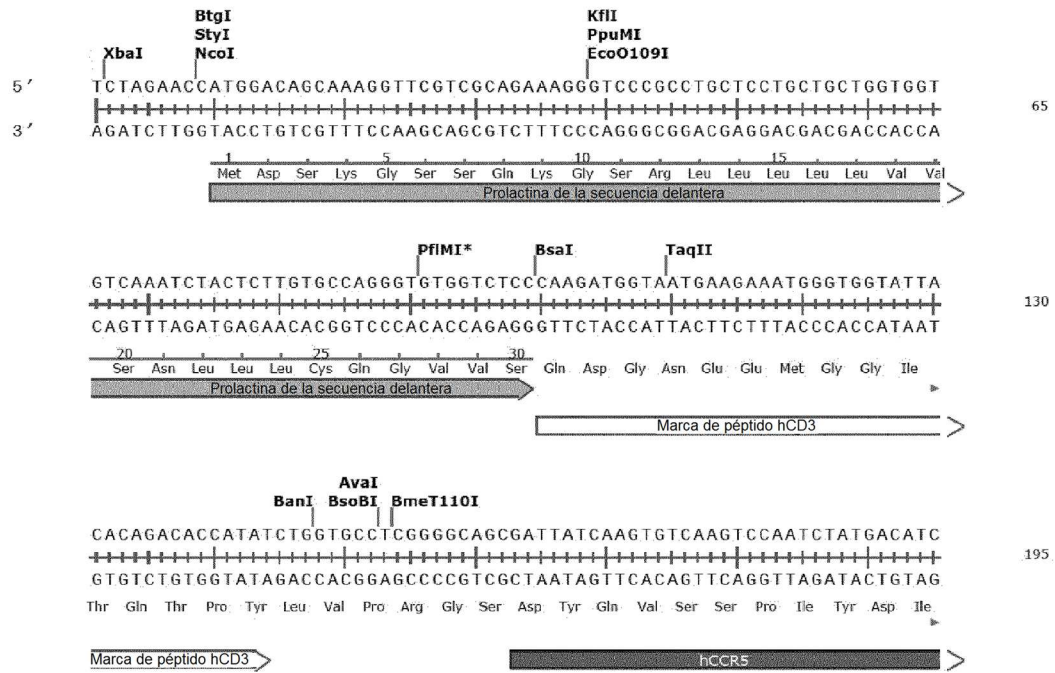


Figura 6

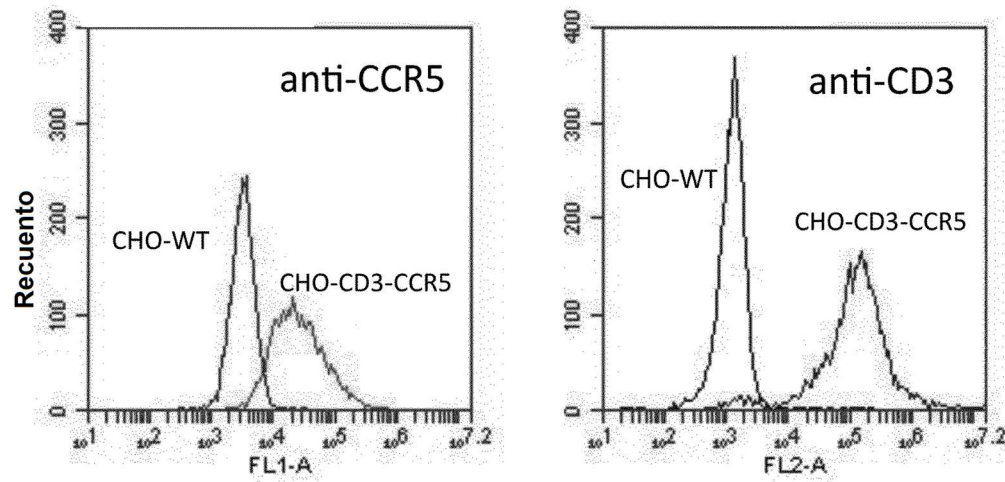


Figura 7A



Figura 7B



Figura 8

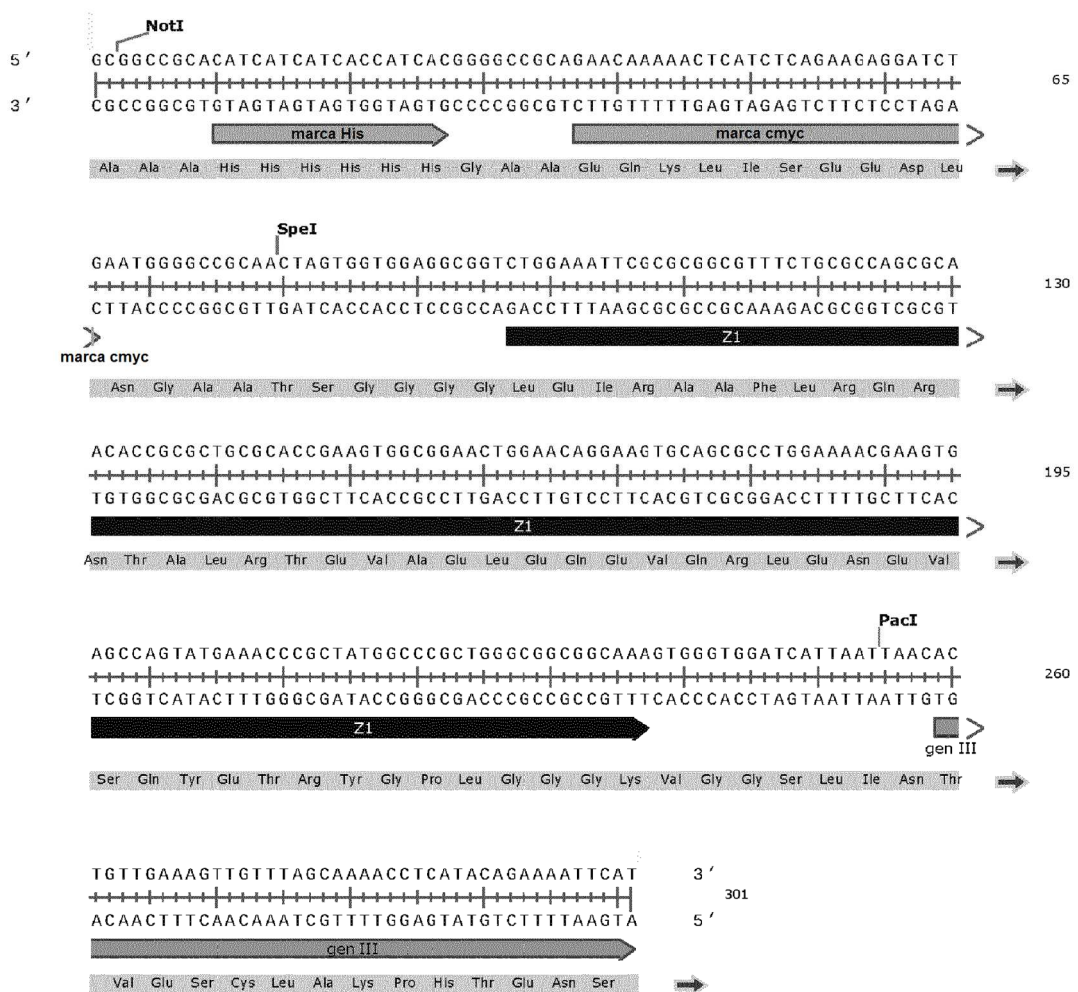


Figura 9A

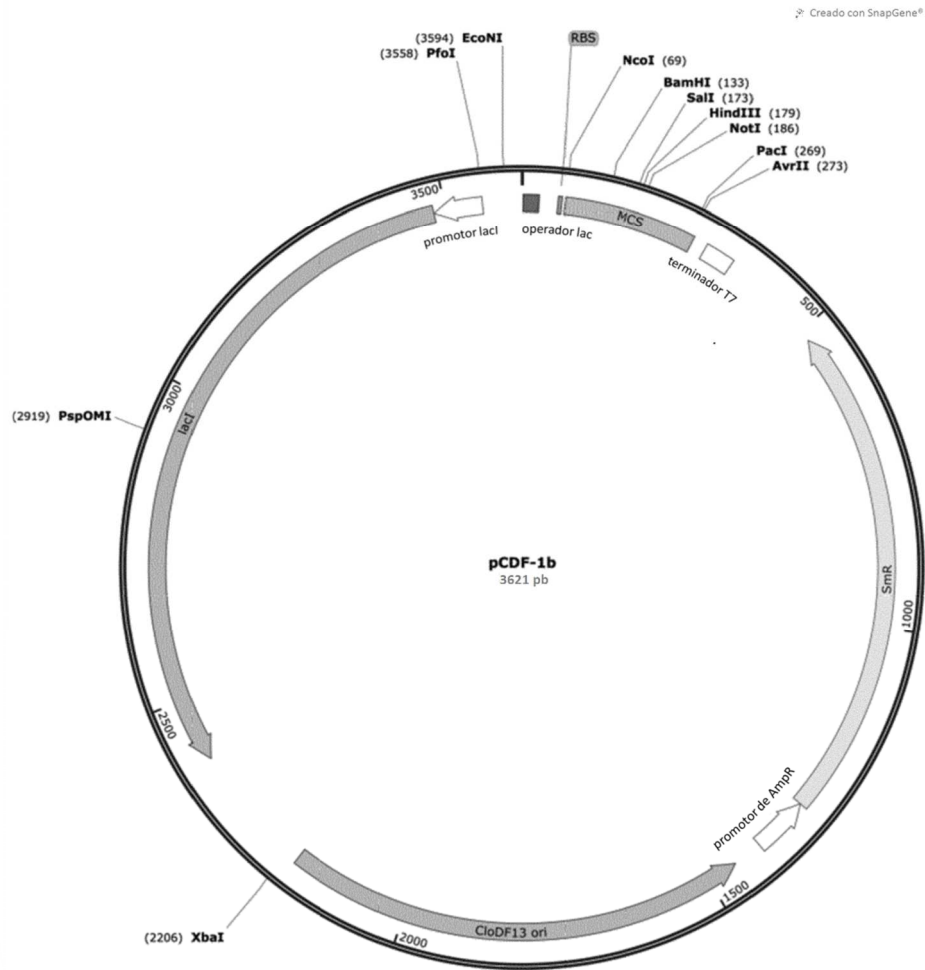


Figura 9B

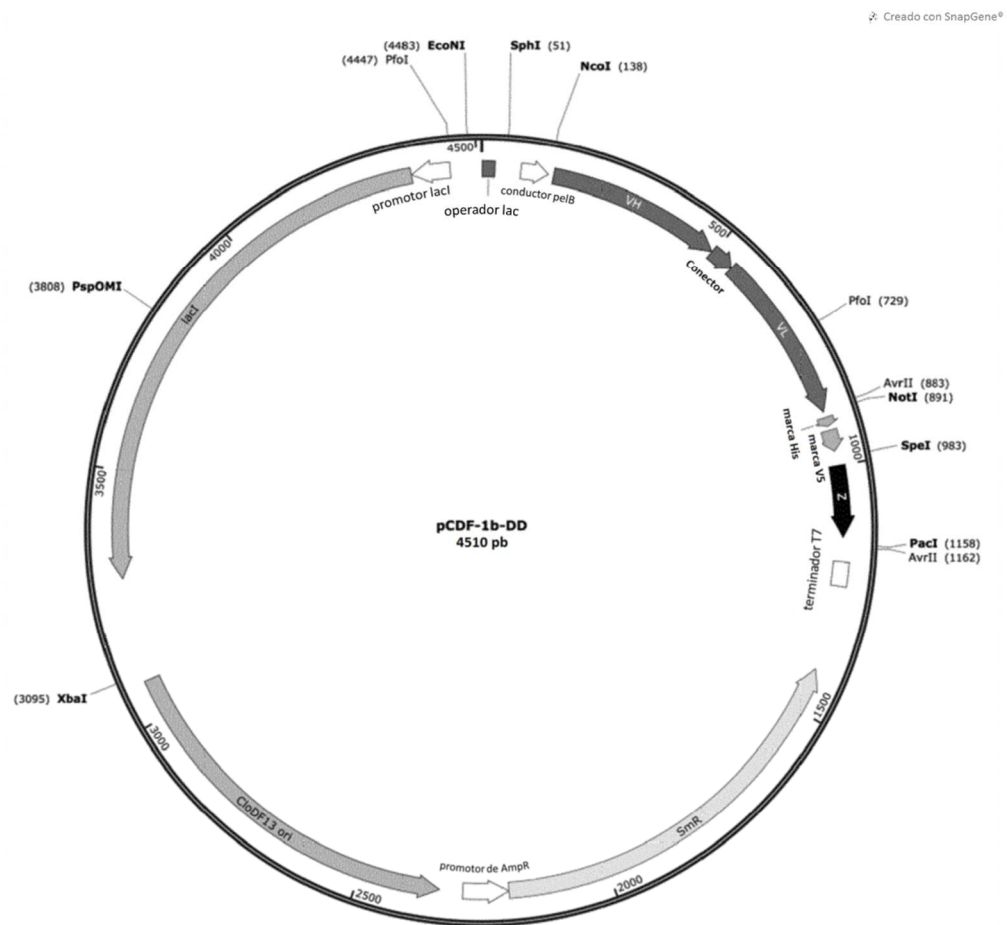


Figura 10A

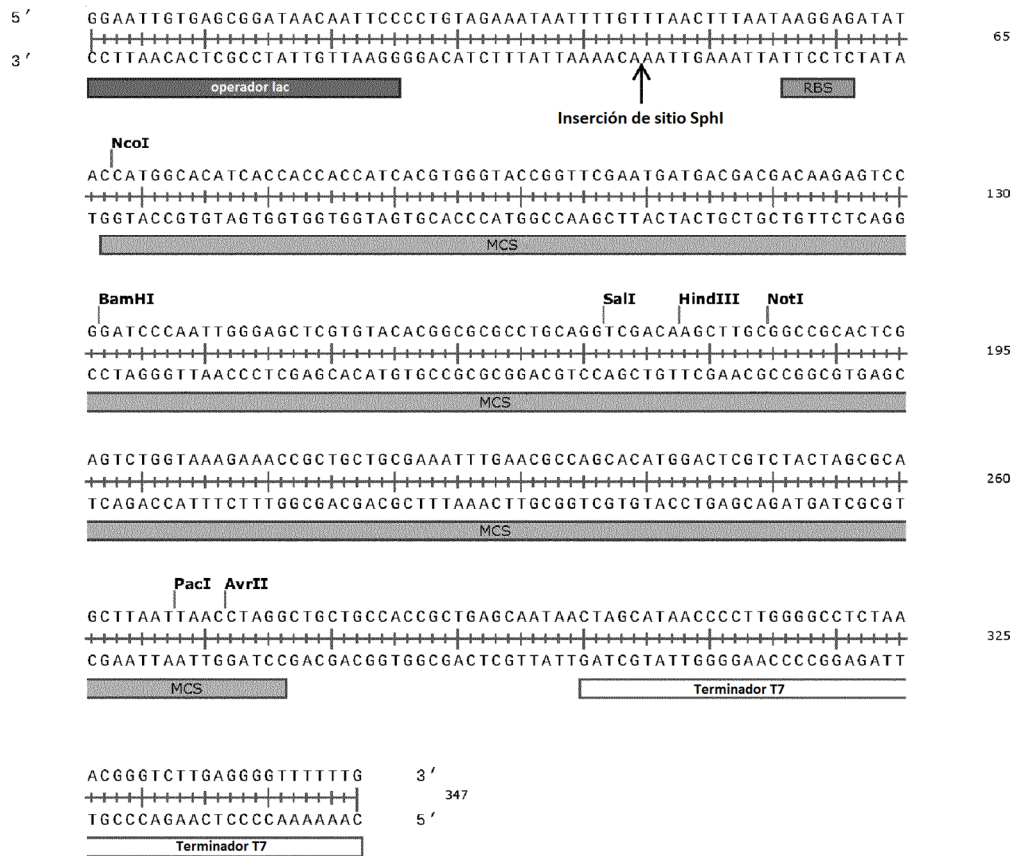


Figura 10B

