

Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria

✉ Nelson S Vispo, Yaquelin Puchades

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Playa. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: nelson.santiago@cigb.edu.cu

RESUMEN

Los virus más estudiados y los que más han contribuido al desarrollo de la Biología Molecular son los bacteriófagos. Su acción lítica sobre bacterias patógenas permitió su uso como alternativa terapéutica frente a infecciones bacterianas. Su eficacia ha sido probada incluso contra microorganismos resistentes a antibióticos. Las bibliotecas combinatorias de péptidos o proteínas presentadas en la superficie de fagos filamentosos ha permitido la identificación de moléculas novedosas con propiedades de unión muy útiles para aplicaciones médicas e industriales. Las investigaciones con fagos continúan aumentando la complejidad de los métodos de presentación de proteínas sobre su superficie. Es posible que estas bibliotecas biológicas brinden solución a la mayoría de los problemas de unión entre moléculas, cuya aplicación más efectiva resulte la que explore exhaustivamente esta dificultad combinando ciclos de selección (*biopanning*) y determinación de secuencias de ADN. Esta tecnología tiene el potencial para generar extensas bases de datos que incluyan las relaciones entre la estructura de las proteínas y su función biológica.

Palabras claves: bibliotecas combinatorias, presentación en fagos, terapia con fagos

Biotecnología Aplicada 2001;18:135-147

ABSTRACT

Bacteriophages: from Phage Therapy to Combinatorial Biology. Bacteriophages (phages) are the most studied viruses and the major contributors for the development of Molecular Biology. Their lytic action over pathogenic bacteria makes them useful as an alternative therapy for the treatment of bacterial infections. Their efficacy has been proven even against several drug-resistant bacteria. Phage display of a wide range of polypeptides has been increasingly used to identify novel molecules with useful binding properties for research, medical and industrial applications. Bacteriophage researchs have improved the sophistication of methods used for phage display of proteins. These biological libraries will probably give a solution for most of the binding problems between molecules, and the best application would be that exploring this difficulty by means of combination of selection rounds (*Biopanning*) and determination of DNA sequences. This technology has the potential to generate vast databases containing relationships between protein structure and biological activity.

Keywords: combinatorial libraries, phage display, phage therapy

Antecedentes

En 1896, Hankin reportó que el agua de los ríos Ganges y Jumna, en la India, tenía una acción bactericida marcada y que podía pasar a través de un fino filtro de porcelana sin perder esta propiedad. La actividad se perdía si se hervía el agua. Hankin estudió este efecto, en particular sobre *Vibrio cholerae*, y sugirió que la sustancia responsable hacía que la epidemia del cólera no se expandiera si se ingería esta agua [1]. Edward Twort [2] y Félix d'Herelle [3] informaron por separado el aislamiento de entidades filtrables capaces de destruir cultivos de bacterias o producir pequeñas áreas de color más claro cuando las bacterias eran crecidas a confluencia en placas de medio sólido. Fue el canadiense Félix d'Herelle, cuando trabajaba en el instituto Pasteur de París, quien dio el nombre "bacteriófagos", utilizando el sufijo "fagos" no en el sentido estricto de comer, sino en el de vivir a expensas de [4].

Se han descrito 12 familias de bacteriófagos con diferentes características estructurales y genéticas (Tabla 1). En todos los grupos, con excepción de los pertenecientes al género *Inovirus*, el ácido nucleico está contenido en una cápsida polihédrica unida en

algunos casos a otra estructura que permite la adsorción al hospedante.

Las primeras investigaciones con fagos estuvieron relacionadas con la definición de la naturaleza de estas partículas; sin embargo, su capacidad de provocar la lisis celular de microorganismos patógenos constituyó la base de muchos trabajos encaminados a su uso terapéutico. La terapia con bacteriófagos comenzó en 1921 por Bruynoghe y Maisin [5] en el tratamiento de infecciones por estafilococos. Aunque los resultados fueron muy promisorios se hizo muy poco en los años sucesivos. La idea de la aplicación terapéutica de los bacteriófagos se abandonó después de la introducción de las sulfonamidas en la práctica médica y, con ellas, de los antibióticos. A pesar de esto, la acción lítica de los bacteriófagos *in vitro* permitió a los investigadores usar fagos específicos para diferenciar entre varias especies de bacterias y se desarrollaron métodos de diferenciación que son muy útiles actualmente en las investigaciones epidemiológicas [6].

A pesar del fracaso en el uso terapéutico de los bacteriófagos, grupos aislados de investigadores con-

Tabla 1. Grupos y géneros de bacteriófagos.

Grupos o familias	Género	Ejemplo	Morfología de la partícula	Envoltura	Genoma
Corticoviridae	Corticovirus	PM2	Isométrica	No	ADN bicatenario
Cystoviridae	Cystovirus	Ø6	Isométrica	Sí	3 segmentos de ARN bicatenario
Inoviridae	Inovirus	Colifago fd	Varilla	No	ADN circular de simple cadena
	Plectrovirus	Fago Acholeplasma			
Leviviridae	Levivirus	Colifago MS2	Icosahédrica	No	1 cadena ARN (+)
	Allolevirus	Colifago Qbeta			
Lipothrixviridae	Lipothrixvirus	Fago Thermoproteus	Varilla	Sí	ADN lineal bicatenario
	Microvirus	Colifago ØX174			
Microviridae	Spirovirus	Fago Spiroplasma	Icosahédrica	No	ADN circular de simple cadena
		Fago Mac-1			
Myoviridae	Plasmavirus	Colifago T4	Fago con cola	No	ADN lineal bicatenario
Plasmaviridae		Fago Acholeplasma	Pleomórfica	Sí	ADN circular bicatenario
Podoviridae		Colifago T7	Fago con cola	No	ADN lineal bicatenario
Siphoviridae		Colifago lambda	Fago con cola	No	ADN lineal bicatenario
Sulpholobus shibatae virus	Fagos del grupo lambda	SSV-1	En forma de limón	No	ADN circular bicatenario
Tectiviridae	Tectivirus	Fago PRD1	Icosahédrica	No	ADN lineal bicatenario

tinuaron los trabajos con el uso de estos agentes para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la tuberculosis y la neumonía. La mayoría de los esfuerzos se concentraron en Rusia y la India, donde los altos precios y la ausencia de disponibilidad de los antibióticos estimularon la búsqueda de alternativas terapéuticas. Aunque la mayoría de estas investigaciones mostró resultados positivos, no hubo cuantificación clínica ni grupos controles, lo que impidió determinar la efectividad de esta terapia.

Las bacterias resistentes a antibióticos se están expandiendo por el mundo, incluso resistentes a los de última generación como la vancomicina [7, 8]. Esta resistencia se disemina principalmente a través de plásmidos, transposones y elementos de inserción. Los marcadores de selección pueden ser transmitidos entre las células de diferentes especies de bacterias. El tratamiento con antibióticos para eliminar microorganismos resistentes a múltiples medicamentos es inefectivo y el crecimiento de las bacterias patógenas resistentes es de gran importancia para la práctica médica.

Existen resultados del período 1987-1999 [9] que muestran que la terapia con bacteriófagos es mucho más efectiva que con antibióticos. En este estudio se incluyeron pacientes con enfermedades infecciosas persistentes causadas por cepas resistentes a antibióticos. Inicialmente se aislaron y caracterizaron las cepas patógenas, se determinó su sensibilidad a bacteriófagos y se preparó un extracto estéril de fagos que fue administrado por varias vías. Además del efecto terapéutico —desaparición de los síntomas y exámenes bacteriológicos negativos—, se demostró que los bacteriófagos incrementan la protección contra infecciones bacterianas mediante destrucción de los microorganismos y regulación del sistema inmunitario. Estas alternativas se pueden usar en combinación con agentes antimicrobianos como los antibióticos o como único tratamiento en las infecciones ocasionadas por patógenos de importancia clínica, por ejemplo, las cepas de los géneros *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, entre otras.

Varios investigadores concuerdan en que el mayor obstáculo para la terapia con bacteriófagos es el pro-

prio sistema inmunitario, que tiende a eliminarlos rápidamente. Esta evidencia sugiere que los fagos no permanecen viables en el torrente sanguíneo o en los tejidos del organismo el tiempo suficiente para lograr alcanzar los sitios de infección e infectar las bacterias patógenas. Esta desventaja potencial, unida a la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, ha propiciado la búsqueda de variantes novedosas de fagos capaces de evadir los mecanismos del sistema inmunitario.

Con este objetivo se han desarrollado varios métodos, pero los más útiles son la selección de fagos, mutados o no, con mayor tiempo de vida media en los tejidos del organismo mediante pases múltiples en ratones, y la obtención de bacteriófagos modificados genéticamente que presenten en su superficie péptidos o moléculas que antagonicen una o varias de las funciones del sistema inmunitario. Dentro de las moléculas que se pueden expresar en la cápsida de los fagos filamentosos con posibilidades de impedir la inactivación del virus, se encuentran los péptidos y moléculas antagonistas de cualquiera de las vías del sistema del complemento, las interleuquinas y otras citoquinas, así como proteínas glicosiladas y factores de inhibición [10].

Estudios de Biología Molecular

La era moderna de los estudios con fagos comenzó con los trabajos de Max Delbrück en 1938. Rápidamente otros investigadores como Salvatore Luria se unieron a Delbrück en el establecimiento de la investigación de los bacteriófagos como vía para poder comprender las características fundamentales de la vida biológica. Mientras se desarrollaban estos estudios se definió la naturaleza viral de los fagos, se determinó la composición química del virión (proteínas y ADN), se aislaron nuevos fagos a partir de diferentes hospedantes microbianos, y se obtuvieron algunos progresos en el entendimiento del ciclo de vida viral. Las primeras microfotografías electrónicas de fagos fueron obtenidas en 1942 por Thomas Anderson [11].

A pesar de que los fagos son virus simples estructural y genéticamente, han resultado particularmente útiles en el estudio de varios fenómenos moleculares. Los

descubrimientos realizados con bacteriófagos constituyeron la base del desarrollo de la biología molecular. Durante los primeros años posteriores a su descubrimiento y hasta principios de la década de 1960, el trabajo con estos virus permitió identificar los ensayos de placas de lisis [3, 12], la naturaleza del ciclo de vida viral [13, 14], los tipos de mutaciones genéticas [15-17], que los genes son segmentos de ADN [18], la transferencia de genes entre células mediadas por virus [19], las enzimas de restricción y modificación [20, 21], la colinealidad de genes y proteínas [22], y el ADN genómico de simple cadena del bacteriófago ϕ X174 [23].

A partir de 1960, las investigaciones con bacteriófagos continuaron mostrando resultados asombrosos: la descripción del ARN mensajero [24], la naturaleza del código genético [25], el carácter físico de la recombinación genética [26], el mecanismo de acción de los factores de transcripción [27, 28], la recombinación sitio específica [29-31], la descripción de la ADN ligasa [32] y la antiterminación como mecanismo de regulación transcripcional [33]. Se describieron nuevas características del mecanismo de replicación del ADN: la síntesis discontinua de una de las cadenas mediante los fragmentos de Okazaki [34], el mecanismo de replicación por círculo rodante [35] y el papel de los cebadores de ARN en la etapa de iniciación de este proceso [36]. Se logró la visualización y separación de proteínas mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo a su peso molecular [37, 38]. Otros estudios con fagos conllevaron a la identificación de las chaperoninas [39], a la caracterización de secuencias de inserción y transposones [40], al hallazgo de genes sobrelapados [41], a la descripción de la retroalimentación negativa como mecanismo de regulación transcripcional [42], y al uso de fagos reporteros de actividad luciferasa para el diagnóstico médico [43].

Alrededor de 1970, el mundo de la biología comenzó a transformarse producto de la “revolución del ADN recombinante”, con la cual se logró introducir genes de cualquier organismo, sin importar su complejidad, en el genoma de fagos. Esta revolución provocó profundos cambios en las investigaciones con bacteriófagos, al igual que en otras áreas de la biología. El número de investigadores que trabajaban directamente con bacteriófagos disminuyó precipitadamente, lo que hizo posible el estudio de genes de organismos más complejos con métodos tan sencillos como los que permitieron el estudio de los fagos y las bacterias. Al mismo tiempo se incrementó el número de científicos que usaban algunas formas de bacteriófagos en sus estudios, ya que la mayoría de las técnicas de la biología molecular moderna son derivadas de fagos. Y así como la tecnología de ADN recombinante y otras técnicas hicieron posible el estudio molecular de varios organismos, también incrementaron la complejidad de los experimentos que se realizan con bacteriófagos. De manera que para aquellos problemas científicos donde los fagos representan un sistema ventajoso, éstos continúan resultando una herramienta de estudio sencilla y versátil.

Biología Combinatoria

Los fagos filamentosos pertenecen a una familia de Inovirus que infectan las bacterias Gramnegativas. Están constituidos por una envoltura proteica tubular en cuyo interior se encuentra una molécula de ADN

circular de simple cadena de 6,4 kb. La partícula viral tiene 900 nm de largo y 6,5 nm de diámetro y está integrada por cinco proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX. El cuerpo de la partícula está formado por 2 700 copias de pVIII [44]. Los extremos son cerrados por cinco copias de las proteínas pVII y pIX en un lado, y pVI y pIII en el otro. Estos virus infectan solamente bacterias que expresan las fimbrias sexuales, codificadas por el factor F. La unión del fago a esta estructura ocurre a través de pIII (Figura 1).

En 1982, Dulbecco [45] sugirió que péptidos inmunogénicos derivados de epítomos bien caracterizados de agentes patógenos, podían ser fusionados a las proteínas de la cápsida del fago lambda u otros virus. La partícula viral resultante que presenta el péptido foráneo en su superficie, podía ser utilizada como componente principal de vacunas libres de células.

En 1985, George Smith [46] demostró que el genoma de los fagos filamentosos o fd podía ser manipulado con facilidad para obtener partículas fágicas que presentaran péptidos fusionados a proteínas de su superficie y estos péptidos expuestos podían ser reconocidos por el anticuerpo correspondiente. Estas observaciones estimularon las investigaciones posteriores en este campo y favorecieron el establecimiento de la tecnología de presentación de péptidos y proteínas.

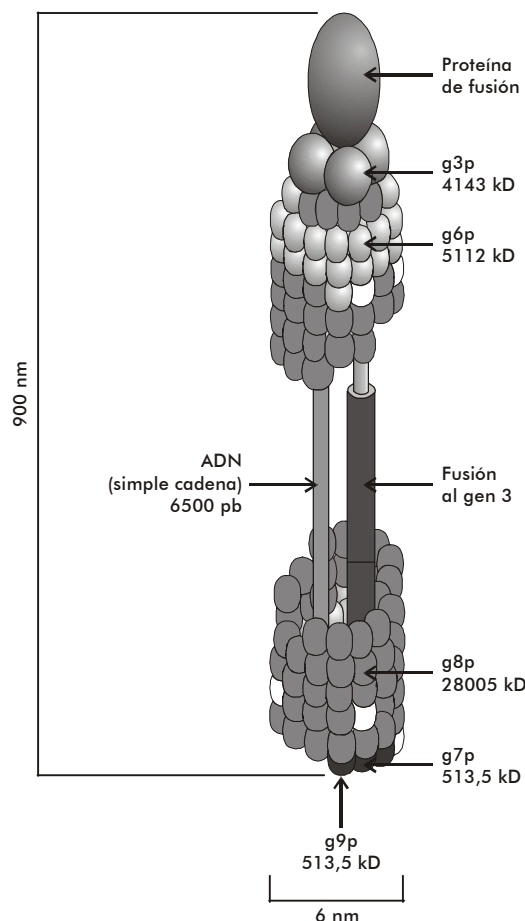


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de los fagos filamentosos.

Los rápidos avances ocurridos en los últimos años en las estrategias experimentales usadas para identificar y caracterizar los sitios de unión de un receptor a su ligando, han dado una nueva dimensión a este problema de la ciencia. Estas nuevas tecnologías se basan en un tema común: la preparación de mezclas de un gran número de moléculas cuyas secuencias o estructuras han sido aleatorizadas previamente, y el diseño de métodos que permitan identificar propiedades de unión específica dentro de este repertorio. Esta concepción ha llevado a los químicos a la creación de repertorios "sintéticos" y, por ende, al desarrollo de la Química Combinatoria, y a los biólogos moleculares, a la creación de repertorios "genéticos" y al desarrollo de la Biología Combinatoria. De estos últimos, el sistema que más atención ha recibido en esta década, por su simplicidad y versatilidad, es la llamada "tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de los fagos (bacteriófagos) filamentosos (TPFF)" (*phage display technology*).

Tecnología de presentación de proteínas y péptidos en la cápsida de bacteriófagos filamentosos

La tecnología de presentación en la superficie de fagos se basa en la capacidad de exponer un péptido o una proteína de interés en la cápsida de un bacteriófago. Comienza con la fusión de un polipéptido X a una proteína de la cápsida del fago para estudiar sus propiedades de unión a una molécula blanco Y. Con este objetivo es necesario clonar la secuencia nucleotídica del polipéptido X fusionada al gen de la proteína de la cápsida. El segundo paso consiste en la construcción de una gran colección de clones, cada uno de los cuales sintetiza una variante diferente de la secuencia del polipéptido originalmente fusionado. La molécula blanco Y unida a una fase sólida puede ser usada para separar por afinidad aquellos fagos que presenten un polipéptido X con propiedades de unión a dicha molécula. La unión física entre el polipéptido X y su gen, mediada por la fusión a la proteína de la cápsida, permite la clonación y determinación de las secuencias nucleotídicas que codifican las variantes del polipéptido X que se unen a la molécula blanco Y [47].

Las dos proteínas de la cápsida que se han utilizado para la presentación de péptidos foráneos son pIII y pVIII. En los dos casos, la inserción tiene lugar en el extremo amino o cerca de él. El gran número de copias de pVIII en una partícula fágica contrasta con las cinco que existen de pIII. Esto constituye una diferencia importante entre los dos tipos de fusión, lo que las hace características para propósitos diferentes: la selección de uniones de baja afinidad o de alta afinidad, respectivamente [48].

Se han desarrollado dos tipos de vectores fundamentales: el primero se utiliza para obtener partículas fágicas en las que todas las proteínas de la cápsida se encuentran modificadas (sistema de un solo gen), y en el segundo, se producen virus quiméricos en los que se obtienen dos versiones de las proteínas de la cápsida: una modificada y otra de tipo salvaje (sistema de dos genes). El primer tipo de vectores se ha utilizado principalmente para pIII, cuyas funciones biológicas no se afectan significativamente con las fusiones a su extremo amino. Por el contrario, la inserción de péptidos

de más de 10 aminoácidos en todas las copias de la proteína pVIII ha sido un fracaso debido a que no permite el ensamblaje de la cápsida [49].

George Smith [46] fue el primero en demostrar que pIII podía ser utilizada para presentar péptidos en la superficie de fagos filamentosos utilizando un sitio de restricción de la enzima *Bam*HI cerca del centro de la secuencia codificadora de la proteína. Parmley y Smith [50], describieron una familia de vectores en los cuales el ADN foráneo puede ser insertado en el extremo 3' de la señal de secreción de la proteína pIII.

Los vectores del sistema de dos genes utilizan la expresión concomitante de la molécula recombinante y la de tipo salvaje. Esto se logra mediante la fusión en tándem del gen en el genoma del fago, donde una de las dos copias se modifica, o utilizando un sistema de fagómidos. Los fagómidos son plásmidos que portan la región intergénica de un fago filamentosos y pueden ser empaquetados como ADN de simple cadena en partículas virales con la ayuda de un fago auxiliador [51]. En estos plásmidos, los genes III y VIII recombinantes son presentados en un vector de expresión que contiene el origen de replicación de los fagos [52]. Las bacterias transformadas con estos plásmidos son superinfectadas por un fago auxiliador y el resultado es la liberación de un fago híbrido al medio de cultivo.

El fago auxiliador denominado M13K07 se construyó con el objetivo de incrementar la producción cualitativa y cuantitativa de ADN plasmídico de simple cadena. Este fago derivado del M13 presenta una sustitución de bases G por T en el gen II, la cual cambia el codón 40 de M a I. Esto resulta en una proteína pII que funciona eficientemente en un origen de replicación que sólo contiene el dominio A. Además, tiene el origen de replicación de p15A y el gen de resistencia a kanamicina del transposón 903, ambos insertados en el sitio *Ava*I del origen de replicación. De este modo, los dominios A y B quedan separados entre sí y a los efectos de la replicación este origen sólo tiene el dominio A.

Cuando el fago M13K07 se cultiva solo; o sea, en ausencia de fagómido, pII funciona con suficiente eficiencia en el origen de replicación alterado produciendo altos títulos de fago. En cambio, cuando crece en presencia de un fagómido, el origen de replicación de M13K07 es menos eficiente que el origen de tipo salvaje presente en el fagómido. Este hecho, unido al alto número de copias del fagómido, conduce al empaquetamiento preferencial del ADN fagomídico en las partículas virales [51].

El origen de replicación de p15A le permite al fago replicarse independientemente de la función de pII, y así evitar los efectos de interferencia que aparecen cuando el fago crece en presencia de un fagómido; es decir, la reducción del número de copias del fago, puesto que el fagómido interfiere en su replicación. El gen de resistencia a kanamicina permite la detección del fago con una alta sensibilidad como unidades de transducción, ya que si se siembran células infectadas en un medio con kanamicina, una sola infección exitosa conduce a un clon visible. El uso del fago auxiliador M13K07 para la producción de ADN plasmídico de simple cadena, permite obtener normalmente títulos de 1×10^{11} UT/mL (unidades de transducción/mL). Se ha logrado el empaquetamiento de fagómidos como ADN de simple

cadena con insertos de hasta 9 kb, sin pérdida significativa de rendimiento ni inestabilidad [51].

El empleo del fago auxiliador en combinación con un fagómido tiene ventajas importantes: las células infectadas sobreviven, crecen y continúan secretando partículas virales indefinidamente. Los clones pueden ser propagados como plásmidos y como fagos. Dado que el fago contiene un genoma de ADN circular de simple cadena, la secuencia nucleotídica se puede analizar rápidamente. La información foránea se puede clonar y expresar como parte de una proteína estructural del virus, y como el virus recombinante es secretado por la célula en el sobrenadante del cultivo, su purificación se simplifica considerablemente.

Los primeros trabajos en los que se aplicó la tecnología de presentación en la superficie de fagos emplearon la fusión a pIII. El primero de ellos lo realizó Smith en 1985 [46] y consistió en la clonación de un fragmento del gen de la endonuclease *EcoRI* de 171 pb en un sitio *BamHI* del gen III, de modo que la secuencia foránea quedaba insertada entre los dos dominios de pIII, sin afectar su función. Esta proteína híbrida se incorporó en el virión, que mantuvo la infectividad y presentó los aminoácidos foráneos de forma inmunológicamente accesible, ya que mediante el uso de un anticuerpo anti-*EcoRI* se obtuvo una reducción de los títulos de fago. La actividad neutralizante de fago fue totalmente bloqueada por preincubación con la endonuclease *EcoRI* purificada. Mediante una purificación por afinidad con el anticuerpo mencionado, este fago fue enriquecido entre 1 500 y 7 200 veces en relación con el fago de tipo salvaje.

El siguiente trabajo lo desarrollaron Parmley y el propio Smith en 1988 [50]. En él se propuso un mejoramiento del diseño del vector tomando como sitio de clonación el extremo amino de pIII —con lo cual disminuyen los efectos de los insertos en la función de la proteína— y utilizando como vector parental a fd-tet, que permite la propagación como plásmido independientemente de la infección continua, reduce la demanda de la función de pIII y puede ser detectado sensiblemente como unidades de transducción gracias al gen de resistencia a tetraciclina. En este vector mejorado se realizó la clonación de varios insertos de diferente talla y orientación. Todos ellos fueron estables y no produjeron efectos notables en la función de pIII. Los aminoácidos foráneos se expresaron en la superficie del fago y algunos clones que portaban fragmentos de un gen blanco expresaron determinantes reconocidos por un anticuerpo específico contra el producto génico. En este trabajo se describe por primera vez el método de *biopanning* para la purificación por afinidad del fago que porta el fragmento foráneo.

El procedimiento de *biopanning* es una purificación por afinidad donde la biblioteca de fagos se hace reaccionar con un anticuerpo (Figura 2). Los fagos unidos se recuperan por ruptura de los enlaces no covalentes entre la molécula presentada y la molécula blanco a pH ácido (pH 2), sin eliminación de la infectividad del fago. En los primeros trabajos se explotaba la fuerte unión biotina-estreptavidina y la biblioteca de fagos se hacía reaccionar con un anticuerpo biotinilado, posteriormente los reaccionantes específicos se unían a una placa de Petri revestida con estreptavidina. Este método de selección se ha desarrollado y actualmente se utilizan

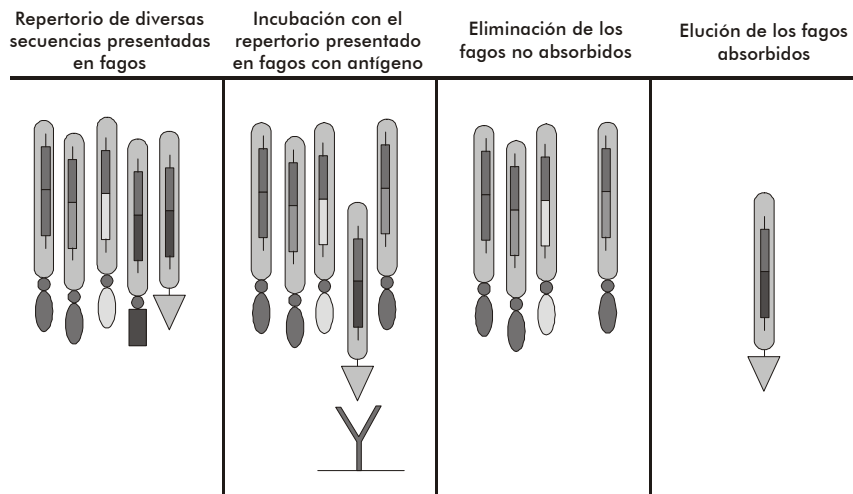


Figura 2. Representación esquemática del procedimiento de *biopanning*.

diferentes soportes como perlas y placas de poliestireno, donde la molécula selectora se une directamente al soporte sólido sin necesidad de biotilar.

El método de *biopanning* es muy ventajoso con respecto a las técnicas de análisis tradicionales, puesto que la selección por afinidad es mucho más fácil y efectiva que el análisis masivo de un gran número de clones. El *biopanning* permite obtener mayores rendimientos y enriquecimientos con requerimientos de anticuerpo más bajos [45]. Mediante este método se seleccionan preferencialmente clones que portan péptidos que se enlazan al sitio de unión del ligando con contactos atómicos similares a los del epítipo natural; o sea, péptidos relacionados con el antígeno originalmente utilizado para producir el anticuerpo [48].

Cuando se realizan dos o más rondas continuas de *biopanning*, se produce un efecto acumulativo que consiste en una reducción significativa del número de partículas del fago blanco, con la posible pérdida de clones raros. Esto se puede solucionar mediante una amplificación intermedia después de la cual los fagos resultantes pueden ser sometidos nuevamente a *biopanning* sin pérdida de esos clones poco frecuentes. El siguiente ejemplo ilustra este hecho: en el propio trabajo de Parmley y Smith [50], después de dos rondas de *biopanning* sin amplificación intermedia, se obtuvo un enriquecimiento global de 10^6 . Sin embargo, cuando se realizaron tres rondas con amplificación intermedia, dicho parámetro fue de $1,25 \times 10^7$.

El método de *biopanning* no discrimina entre uniones de afinidad moderada (K_d micromolar) o alta (K_d nanomolar). Como se explicó anteriormente, la selección de fagos que portan péptidos que se unen a su blanco con afinidad relativamente baja, se debe a interacciones multivalentes entre el fago y la molécula blanco. No obstante, es posible combinar ventajosamente condiciones que favorezcan interacciones multi y monovalentes: en las primeras rondas de *biopanning* se debe promover la interacción multivalente puesto que la unión de alta avidéz permite la selección de una gran muestra de péptidos que se han unido a su blanco en un rango amplio de afinidades. Esto debe ir acompañado de lavados rigurosos que disminuyan el fondo

de fagos que se unen inespecíficamente. En las últimas rondas se deben favorecer las interacciones monovalentes para lograr el enriquecimiento de los péptidos que se unen con mayor afinidad [53].

Bibliotecas peptídicas.
Localización de epítomos lineales

La construcción de grandes bibliotecas de péptidos aleatorios fusionados a pIII se reporta por primera vez en 1990 [54]. En los últimos años, diferentes grupos se han enfocado en la construcción de bibliotecas peptídicas y en la selección contra una molécula blanco.

Los AcM se encuentran en el centro de muchos campos de aplicación. Su utilización en el diagnóstico inmunológico para la detección, localización y cuantificación de un antígeno, la inmunoradioterapia, los procesos de inmunopurificación, la inmunomodulación, la terapia mediante su unión a toxinas y su empleo eficaz en los estudios de estructura y función, los convierten en poderosas herramientas de la biotecnología. La identificación y caracterización de los residuos aminoacídicos que intervienen en la unión de un anticuerpo a su antígeno específico, abre numerosas posibilidades en el diseño de vacunas sintéticas de subunidades y de agentes terapéuticos peptídicos tanto naturales como sintéticos.

La identificación de los epítomos reconocidos por los AcM se ha realizado tradicionalmente probando colecciones de fragmentos peptídicos derivados del antígeno, hasta identificar el segmento mínimo de la secuencia que reacciona con el anticuerpo. Otros grupos han utilizado también colecciones de péptidos sintéticos o de fragmentos de ADN complementario expresados *in vitro*.

La utilización de bibliotecas peptídicas de fagos filamentosos presenta como ventajas adicionales sobre las demás técnicas químicas o biológicas, la asociación física entre la información genética y el fenotipo, y la selección y amplificación de esta información en *Escherichia coli*. Este procedimiento permite identificar y caracterizar los péptidos seleccionados aun cuando se recuperen sólo pequeñas cantidades en el proceso de selección (en teoría, hasta el nivel de una sola partícula). Estos péptidos que mimetizan al antígeno natural se denominan fagótopos.

Scott y Smith en 1990 [54] describieron la construcción de una biblioteca de péptidos de seis residuos aminoacídicos que contenía alrededor de 200 millones de clones fusionados al extremo amino de pIII. Esta biblioteca fue utilizada para seleccionar clones que se unen específicamente a dos AcM que reconocen la secuencia **DFLEKI** en el péptido lineal y como parte de la proteína miohemeritina. Los autores fueron capaces de aislar clones independientes similares al epítomo original que contenían la secuencia consenso **DFL**.

Cwirla y colaboradores [53] también reportaron otro ejemplo de imitación del antígeno a partir de clones seleccionados de una biblioteca de péptidos donde el epítomo original es representado por una secuencia continua del péptido. Se construyó una biblioteca de hexapéptidos en el extremo amino de pIII y se hizo reaccionar el AcM 3E7, el cual reconoce la secuencia YGGF de la b-endorfina. Los cincuenta y un clones seleccionados por afinidad presentan una tirosina en la

primera posición y la mayoría expone una glicina en la segunda posición. Casi todos estos clones seleccionados muestran una baja afinidad por el anticuerpo, pero a bajas concentraciones de 3E7 durante la selección por afinidad se logró seleccionar fagos con mayor afinidad y los dos mismos aminoácidos presentes en la primera y segunda posición. La mayoría de los clones tenían la secuencia YGGFL, que se une al anticuerpo con gran afinidad.

Un epítomo es continuo (lineal, secuencial o primario) si se encuentra formado por residuos adyacentes en la secuencia primaria y, por lo tanto, presentes en la proteína desnaturalizada o en un fragmento apropiado de ésta [55]. Los AcM contra epítomos lineales pequeños de un antígeno proteico han sido utilizados por diferentes grupos como sistema modelo para seleccionar fagos que portan el péptido reconocido específicamente por el AcM. En la mayoría de los casos, el péptido presentado por el clon seleccionado muestra una secuencia similar a la del antígeno original.

Como parte de un trabajo integral en estudios de estructura y función de diferentes moléculas, nuestro grupo caracteriza los sitios de unión y la especificidad detallada de varios AcM con lo que aumenta la información disponible desde su uso por primera vez. La Tabla 2 muestra algunos ejemplos de anticuerpos caracterizados, su epítomo reconocido, y el fagótopo identificado.

Un factor limitante del éxito de la tecnología de presentación en fagos es el tamaño de las bibliotecas que se obtienen. Para maximizar las interacciones entre el ligando seleccionado y el blanco al cual se une, sería conveniente presentar péptidos aleatorios relativamente largos. El desarrollo de una tecnología novedosa como el enfoque del Cosmix-Plexing® supera esta limitación [58]. Las bibliotecas utilizadas en esta técnica contienen un sitio único de recombinación dentro del dominio hipervariable. Aunque la principal ventaja de la recombinación inducida por Cosmix-Plexing® se obtiene a través del incremento de la diversidad durante la selección, también se puede utilizar para la producción de bibliotecas grandes (por ejemplo, >10⁹ variantes). Además, se facilita la producción de bibliotecas extendidas mediante la introducción de casetes específicos en las bibliotecas existentes [59].

Localización de epítomos discontinuos o topográficos

La utilización de péptidos sintéticos solapados para obtener información acerca de la estructura del determinante antigénico no es válida cuando se trata de epítomos discontinuos. Los epítomos discontinuos, también llamados conformacionales o topográficos, involucran residuos aminoacídicos separados ampliamente en la secuencia primaria de las proteínas, pero unidos en la proximidad espacial de la proteína plegada. De aquí se explica que un anticuerpo que reconozca este tipo de epítomo pierda la capacidad de unión si se desnaturaliza o se fragmenta el antígeno.

Tabla 2. Ejemplos de anticuerpos monoclonales caracterizados en nuestro laboratorio.

AcM	Epítomo	Fagótopo	Referencias
CB Hep-1	TGPCKTCTTPAQG	CKTCHRPQ	Felici y colaboradores [56]
CB IL-2.1	LNLAQSKNFHLRPR	SLSPQLFPR	Vispo y colaboradores [57]
CB IL-2.2	SETTFM	TFMSQSTG	Vispo y colaboradores [57]

Las evidencias de que un péptido presentado por un fago es capaz de imitar un epítipo discontinuo son todavía limitadas. Felici y colaboradores [60] hicieron el primer reporte en 1993, quienes utilizaron una biblioteca de nonapéptidos presentados en pVIII y el AcM 1B7, que reconoce un epítipo discontinuo de la toxina de *Bordetella pertussis*. Se seleccionaron clones independientes y se probó la capacidad de interacción de los mismos con el AcM. En este caso no fue posible identificar los aminoácidos presentes en la proteína que formaban el determinante antigénico y no se encontró una secuencia consenso entre los diferentes clones.

Balass y colaboradores [61] utilizando el AcM que reconoce el sitio de unión del receptor de la acetilcolina (AcChoR), seleccionaron fagótopos a partir de una biblioteca de hexapéptidos presentados en pIII. Este anticuerpo reconoce un epítipo conformacional puesto que reacciona con la proteína nativa y no con la forma desnaturalizada del AcChoR. Los fagos seleccionados no presentaron ninguna secuencia consenso presente en el antígeno. Un péptido sintético derivado de los fagótopos competía con el anticuerpo por la unión al receptor y era capaz de inhibir su acción neutralizante en ensayos *in vivo*. Aunque en estos dos ejemplos se seleccionaron fagótopos que imitan epítipos conformacionales, no se pudo correlacionar la secuencia obtenida mediante selección con el fago con la región del antígeno que participa en la unión al anticuerpo.

La tecnología de presentación funcional de péptidos en fagos ha sido muy utilizada para identificar los aminoácidos que participan en las interacciones entre moléculas. Estos ligandos presentados en la cápsida de fagos filamentosos han sido fusionados fundamentalmente al extremo amino de la proteína pIII. En estas interacciones, el ligando puede reconocer una secuencia continua en la molécula blanco y ser fácilmente reproducida por un péptido lineal presentado en la cápsida del fago. Si el ligando reconoce una secuencia discontinua, cuyos aminoácidos de la molécula blanco se encuentran unidos sólo en la estructura terciaria, será más difícil encontrar péptidos lineales que sean capaces de imitar el ligando. Por otro lado, los péptidos fusionados expuestos al solvente son flexibles y pueden presentar varias conformaciones, por lo que el precio en reducción de entropía que debe pagar en la unión con una molécula complementaria es elevado. Además, la obtención de datos de estructura a partir del uso de péptidos pequeños se dificulta frecuentemente por el tamaño de la molécula.

Una solución propuesta a este problema es añadir cisteínas en posiciones que promuevan la ciclización de la molécula. Sin embargo, una estrategia alternativa ha sido construir bibliotecas donde el péptido presentado esté limitado a un número de conformaciones mediante el constreñimiento en el marco de una estructura más rígida. Un ejemplo de esto sería la ubicación del péptido en un lazo entre dos hélices α de una proteína bien caracterizada y cuya estructura sea relativamente insensible a sustituciones lo que reduce el costo en entropía y hace a la molécula más asequible a análisis estructurales. Nuestro grupo utilizó la proteína Rop de *E. coli*, cuya estructura es relativamente invariable con las sustituciones. La introducción de un nonapéptido en el lazo ubicado entre dos hélices α atentó contra la es-

tabilidad de la molécula. Sin embargo, con la introducción de péptidos de cuatro y siete aminoácidos se logró obtener un dímero de Rop estable [62]. Nagi y Reagan demostraron que a medida que aumenta el tamaño del péptido insertado, la desnaturalización química y la estabilidad térmica de la proteína disminuye [63].

La localización de epítipos discontinuos mediante el empleo de las bibliotecas constreñidas por cisteína fue reportada por primera vez por el grupo de O'Neil en 1992 [64]. Este grupo construyó una biblioteca de seis aminoácidos flanqueados por dos cisteínas y fusionados a la proteína pIII, para la obtención de un antagonista de la glicoproteína plaquetaria gpIIb/IIIa.

En 1993, el grupo de Luzzago [66] constriñó la biblioteca que construyó Felici en 1991, mediante la incorporación de dos cisteínas a ambos lados de la secuencia de nueve aminoácidos expuesta en la proteína VIII. Con esta nueva biblioteca se definieron los residuos que participan en la interacción de un AcM generado contra la cadena H de la ferritina humana. Este anticuerpo reconoce un epítipo topográfico dentro de la molécula de ferritina. Con el uso de esta biblioteca se aislaron clones que imitaban dos zonas diversas pero muy cercanas dentro de la estructura terciaria de la molécula. Con los resultados de este trabajo, la utilización de las bibliotecas constreñidas por cisteínas comenzó a ser de uso común en la caracterización de epítipos topográficos. En el mismo número de la revista *Gene*, donde Luzzago publicó su trabajo, McLafferty [66] presentó una biblioteca de péptidos de 18 residuos flanqueados por dos cisteínas y fusionados a la proteína pIII, con lo que se logró seleccionar clones de mayor afinidad por un AcM contra la β -endorfina.

En 1995, Koivunen [67] logró seleccionar moléculas ligando contra los receptores de superficie de la fibronectina, la vitronectina y el fibrinógeno, a partir de bibliotecas peptídicas cíclicas de cinco y seis residuos, y una biblioteca lineal de nonapéptidos presentados en la proteína III. Los péptidos seleccionados muestran mayor afinidad cuando se encuentran constreñidos entre residuos de cisteína.

En 1996 se publicaron dos trabajos sobre la utilización de bibliotecas constreñidas con cisteínas. El primero abordaba la selección de un péptido a partir de una biblioteca de talla variable entre cuatro y ocho aminoácidos flanqueados por cisteínas [68]. Este péptido fue seleccionado contra la proteína ICAM1, que funciona como receptor de LFA-1 en la migración de los leucocitos en los procesos inflamatorios. El péptido seleccionado inhibe la unión entre las dos moléculas y funciona como antagonista de este sistema. En el segundo artículo se logró seleccionar péptidos cíclicos que interaccionan con la calmodulina, proteína citoplasmática que se une a calcio y regula la actividad de muchos blancos intracelulares a través de interacciones proteína-proteína [69]. Se seleccionó un péptido antagonista de mayor actividad que los seleccionados previamente a partir de una biblioteca no cíclica.

Las bibliotecas de insertos constreñidos permiten la identificación de fagos que se unen con gran afinidad a la molécula blanco. Debido a que el péptido se encuentra en un contexto más rígido, el número de conformaciones que asume son más limitadas que las de un péptido lineal flexible.

El conocimiento de los mecanismos de restricción conformacional es aún incompleto y, por lo tanto, con vistas a aumentar las posibilidades de unión de un ligando específico a una molécula blanco dada (ya sea un anticuerpo u otra molécula), es aconsejable siempre utilizar varias bibliotecas. Con el propósito de lograr la maduración de la afinidad de los clones seleccionados, es recomendable un segundo paso y construir una subbiblioteca a partir de la anterior para la selección del clon de mejor capacidad de unión.

Fagótopos que imitan epítomos no peptídicos

También se han seleccionado fagótopos cuyas secuencias peptídicas son estructuralmente análogos aparentes de estructuras no proteicas. Devlin y colaboradores [70] y Kay [71] y su grupo aislaron fagótopos que reaccionan con la estreptavidina. Este péptido es capaz de funcionar como análogo de la biotina en ensayos de competencia. Los péptidos seleccionados muestran la secuencia consenso HPQ. Webwer y colaboradores [72] determinaron la estructura cristalina del complejo entre la estreptavidina y el péptido FSHPQNT, y demostraron que la mayor estabilidad la brindaba la red de enlaces de hidrógeno de las cadenas laterales de la histidina, la prolina y la glutamina.

Otras demostraciones de moléculas peptídicas que pueden sustituir ligandos no proteicos se obtuvo de los trabajos de Oldenburg [73] y Scott [74] quienes usaron la lectina concanavalina A para seleccionar fagótopos. Ambos grupos identificaron diferentes familias de fagótopos con la secuencia YPY en los clones de mayor afinidad. Se construyeron péptidos sintéticos a partir de la información obtenida de estas secuencias y se demostró la inhibición de la unión de metil α -D-manopiranosido, su ligando natural.

Estos hallazgos indican que es difícil el diseño de medicamentos no peptídicos que se deriva del análisis de los datos de cristalografía del complejo con el péptido. Las características estereoquímicas del ligando natural no se pueden inferir con facilidad del análisis del péptido seleccionado y su interacción con el ligando. Esto constituye un acercamiento esencial para aquellos proyectos en los que se desconoce la naturaleza del ligando o se conoce que intervienen elementos no proteicos importantes para el reconocimiento de la molécula.

Selección de fagótopos específicos de una enfermedad

En los acápites anteriores se describió la selección mediante el empleo de AcM o moléculas selectoras bien definidas. Sin embargo, esta tecnología se puede aplicar a situaciones en las que la molécula selectora no se conoce o no se está definida, como, por ejemplo, los anticuerpos policlonales presentes en el suero sanguíneo. Esta aplicación más general de la tecnología de presentación de péptidos por fagos abre nuevas vías para la identificación y caracterización de moléculas que pudieran ser utilizadas en sistemas de diagnóstico o para la preparación de vacunas nuevas.

El suero de pacientes que padecen una enfermedad infecciosa contiene frecuentemente una gran cantidad de anticuerpos diferentes contra el agente infectivo. La caracterización de la naturaleza, la especificidad y la afinidad de estos anticuerpos sólo es posible si se

tiene el microorganismo patógeno o si se dispone de la proteína para utilizarla como reactivo. De la misma manera, en otras entidades como las enfermedades autoinmunitarias, la caracterización de los trastornos inmunológicos se realiza con aquellos anticuerpos para los que se ha identificado un autoantígeno.

En todos estos casos en los que se desconoce el antígeno natural o no está disponible fácilmente, es posible utilizar bibliotecas de péptidos presentados en la superficie de fagos filamentosos. Para esto se requiere un juego de muestras de suero de pacientes afectados por la enfermedad en estudio (suero específico o SE) y un juego de sueros de individuos sanos (IS). El objetivo es identificar fagótopos específicos de suero, que reaccionen con todos los sueros de individuos enfermos y no con los de individuos sanos.

El protocolo para este procedimiento fue desarrollado con sueros de individuos inmunizados con una preparación comercial de la vacuna contra el virus de la hepatitis B (VHB), que contiene el antígeno de superficie del virus obtenido por vía recombinante. El suero de los individuos inmunizados fue utilizado como SE. Primeramente se realizó una purificación por afinidad contra el primer SE y con los clones seleccionados se realizó una inmunoidentificación. De esta forma se seleccionaron fagótopos reconocidos por los dos SE, los cuales se hicieron reaccionar con un juego de sueros SE y con un juego de sueros IS. Finalmente se lograron identificar fagótopos que imitaban al antígeno en experimentos de competencia; además, uno de estos clones era muy similar a la secuencia primaria del determinante "a" del antígeno de superficie del virus. En este clon estaba presente la secuencia CKTC altamente reconocida por los sueros de individuos vacunados y por los sueros de individuos infectados [75].

Mediante un estudio de caracterización del AcM CB.Hep-1, específico para el antígeno de superficie del VHB y utilizado en el proceso de purificación del antígeno vacunal Heberbiovac®, se identificaron secuencias que reproducen la región nativa en el antígeno y otras que imitan esta unión mediante cadenas laterales diferentes con superficies topográficas similares. Este resultado garantiza que durante la inmunopurificación se seleccionen aquellas moléculas de antígeno que presentan adecuadamente esta región esencial para el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora frente a subtipos virales diferentes [56].

Esta tecnología nueva y poderosa para el diagnóstico de enfermedades virales fue confirmada posteriormente con el estudio de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). Se siguió la misma estrategia descrita anteriormente y se logró identificar fagótopos [76] que, aunque no representaban una imagen del antígeno del VHC podían ser reconocidos por un panel de SE y no por los sueros IS.

Otros trabajos que han seguido esta línea de investigación aplican esta tecnología en la caracterización de enfermedades autoinmunitarias en los que el agente causal no se conoce pero pueden estar involucradas entidades infecciosas. De esta forma, Dybward y colaboradores [77] identificaron fagótopos que reaccionaban con una muestra significativa de sueros de individuos con artritis reumatoide. Por su parte, utilizando la misma biblioteca de nonapéptidos fusionados

a pVIII, el grupo de Mennuni logró seleccionar fagótopos que imitan un ligando presente en el suero de los individuos con diabetes mellitus tipo I [78]. Un año más tarde definirían fagótopos seleccionados con el suero de individuos prediabéticos [79].

Uno de los elementos que está en detrimento del mimetismo efectivo de los péptidos seleccionados con esta técnica es inherente a la propia metodología. Los anticuerpos policlonales obtenidos contra péptidos presentados por el fago que se encuentran parcialmente estructurados, tienen una baja probabilidad de reaccionar contra el antígeno original. Otro aspecto a tomar en consideración es que los fagótopos seleccionados con AcM presentan péptidos que se unen específicamente a este anticuerpo, pero la forma en que representen una imagen positiva del antígeno original depende de cómo representan verdaderamente una imagen negativa del anticuerpo que lo seleccionó. El proceso de caracterización para los AcM tiende a seleccionar un solo sitio de unión en particular del repertorio que se adapta diferencialmente al epítipo. Desde el punto de vista de la unión, el mejor fagótopo seleccionado con un AcM puede tener una adaptabilidad excelente para un parátipo en particular, pero esta capacidad de imitar al antígeno original depende completamente de la forma y las propiedades moleculares del sitio de unión del anticuerpo. Por eso, es posible que los fagótopos seleccionados con AcM no sean los mejores para inducir el repertorio de receptores de células B, que después de la inmunización, proceden a presentar el antígeno al sistema inmune virgen a través de células presentadoras de antígeno profesionales. Sobre la base de estas consideraciones, se puede concluir que una familia de anticuerpos contra el mismo epítipo (en vez de un solo AcM) puede darnos una imagen negativa más estricta del antígeno.

Fagótopos como inmunógenos

La respuesta inmunológica que se obtiene cuando se inyectan las partículas virales de los bacteriófagos filamentosos es dependiente de células T y no requiere el uso de adyuvantes. El uso de los fagos filamentosos como adyuvantes inmunológicos fue propuesto por primera vez por de la Cruz y colaboradores [80] en 1988. Estos investigadores mostraron que la fusión de un péptido corto del circumsporozoito de la malaria en el extremo amino de pIII produce un fago recombinante capaz de inducir anticuerpos específicos contra el péptido.

Este hallazgo fue explotado por el grupo de Perham, quienes clonaron las secuencias que codifican péptidos de la malaria fusionadas a pIII y pVIII, y obtuvieron una buena respuesta de células T y B [81, 82]. Minenkova [83], en 1993, fusionó el determinante antigénico de la proteína gap del VIH a pVIII y lo utilizó como inmunógeno, con lo que obtuvo buenos títulos de anticuerpos en conejo.

Los fagótopos seleccionados por su capacidad de unirse a AcM de manera específica son buenas imitaciones del antígeno, pero esta propiedad no está correlacionada en todos los casos con la inducción de la producción de anticuerpos contra el antígeno natural cuando se usan como inmunógenos. De manera general, cuando los AcM utilizados como moléculas de selección son específicos contra epítipos continuos, se obtiene una buena respuesta contra el antígeno ori-

ginal [84, 85]. La situación se hace más compleja cuando se necesita un mimetismo más elaborado. Fagótopos seleccionados con AcM que reconocen epítipos discontinuos, como el de *B. pertussis*, no logran inducir una respuesta antitoxina en ratones [60]. Por otra parte, dos fagótopos diferentes seleccionados con un AcM contra un epítipo complejo de la oncoproteína HER2/neu mostraron ser buenos mimótopos del antígeno, pero solo uno de ellos fue buen inmunógeno [86].

Mimótopos presentados como fusión a pIII o pVIII, e incluso péptidos sintéticos que reproducen la imagen del fagótopo seleccionado con un AcM, son capaces de inducir la producción de anticuerpos que reaccionan contra el antígeno original. Sin embargo, la conformación del péptido expuesto es importante para la obtención de una respuesta inmunitaria adecuada. Menéndez y colaboradores [87] expresaron el péptido correspondiente a la región variable 2 de la proteína de clase 1 de *Neisseria meningitidis* fusionado a pVIII. Emplearon dos variantes del péptido: una que presenta la secuencia flanqueada por cisteínas y la otra que la presenta flanqueada por cisteínas y tres glicinas. En ratones BALB/c inmunizados con los fagos se detectó que la presencia del espaciador de tres glicinas le permite al péptido adoptar una conformación más adecuada capaz de inducir anticuerpos funcionales contra *N. meningitidis*.

Presentación de proteínas foráneas fusionadas a pIII. Aumento de la afinidad de interacción entre la proteína y la molécula blanco

Los trabajos que describimos a continuación utilizan pIII como molécula de fusión y están encaminados a buscar aumentos de afinidad en las interacciones entre estas moléculas. Explotan las bondades de este sistema de permitir la selección a partir de una biblioteca de mutantes, del fenotipo deseado y, junto con él, su genotipo.

La hormona de crecimiento humana (hGH) fue el primer candidato para la obtención de mutantes de mayor afinidad por su receptor. La hGH fue presentada en la cápsida de los bacteriófagos [88]. Esta hormona había sido ampliamente estudiada y se contaba con una gran cantidad de mutantes puntuales y con los datos de las zonas de interacción con el receptor. Además, la estructura cristalina del complejo hormona-receptor había sido resuelta [89]. La hormona interacciona con su receptor con una alta afinidad ($K_a = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) a través de una interfaz que implica dos hélices, dos minihélices y regiones lazo (sitio 1). Después de la unión al sitio 1, otra zona de la hormona (sitio 2) se une a otro receptor para transmitir la señal.

Para aumentar la afinidad del sitio 1 se construyeron cinco bibliotecas de este sitio, con aleatorización de cuatro residuos aminoácidos. Se realizaron diferentes rondas de selección utilizando el dominio extracelular del receptor y se analizaron los mutantes seleccionados. Se encontraron mutantes que aumentaron su afinidad entre 3 y 6 veces. En algunos casos se mantuvieron los residuos críticos para la unión. Se seleccionaron, además, mutantes más conservados (Arg a Ala) o más radicales (Phe a Ala), fundamentalmente en la periferia del sitio de unión. Los mutantes coseleccionados permitían

obtener una mayor afinidad de forma cooperativa. Todas estas mutaciones se lograron combinar en un "supermutante" con 15 cambios en relación con la molécula de tipo salvaje, y que se unía al receptor con una afinidad 400 veces mayor ($K_a = 10^{12} \text{ M}^{-1}$). Con la incorporación de un mutante que no permitía la unión al sitio 2, se logró obtener un potente antagonista de la hGH. La estructura del "supermutante" con receptor [90] mostró que muchos de los cambios son sutiles; por ejemplo, la sustitución de Phe10 por Ala produce una reorientación ligera de una hélice que incluye varios sitios de contacto.

Cunningham y Wells [91], y Clakson y Wells [92], a partir del análisis de la importancia energética de los 31 residuos involucrados en la interfaz entre la hGH y el dominio extracelular de su receptor, han mostrado evidencias de que el epítipo del sitio de unión funcional es mucho menor que el epítipo estructural (determinado por cristalografía). Además, el cálculo teórico de los residuos relacionados con la antigenicidad de una proteína de forma activa indica que están formados por pocos aminoácidos energéticos rodeados de una superficie que contribuye a la complementariedad [93].

La presentación en la superficie de fagos también ha sido utilizada para cambiar especificidad. El inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI, del inglés *bovine pancreatic trypsin inhibitor*) inhibe diferentes proteasas de serina, pero presenta una afinidad baja ($K_a = 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) por la elastasa humana de neutrófilos (HNE, del inglés *human neutrophil elastase*).

Con la introducción de cuatro mutaciones directas y la construcción de una pequeña biblioteca (900 clones) de 5 residuos presentes en un lazo que se une al sitio activo, se seleccionó una variante del BPTI que se une a la HNE con una $K_a = 10^{12} \text{ M}^{-1}$. Esta afinidad es 50 veces mayor que la del mejor inhibidor de la HNE que se tenía [94]. En este caso no se utilizó una biblioteca aleatorizada, sólo se necesitaron codones específicos para residuos hidrofóbicos.

La IL-2 humana está definida como una clase filogenéticamente bien conservada con un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria. Esta proteína se expresó en la superficie de los bacteriófagos plegada correctamente y biológicamente activa, según se demostró en un ensayo de proliferación en la línea celular CTLL-2 dependiente de esta citoquina. Estos fagos resultaron infectivos y fáciles de propagar, purificar y enriquecer en relación con los fagos utilizados como control [95].

El mismo diseño se ha empleado para lograr un aumento de la afinidad de otras proteínas por su ligando. Un factor común en estos estudios es tener una base de datos extensa de las estructuras de las moléculas para identificar específicamente los residuos que deben ser aleatorizados. Otra variante es aleatorizar la molécula completa, pero en este caso se necesita, por ende, la construcción de bibliotecas mayores. Debido al número limitado de residuos que se pueden examinar por los métodos tradicionales, es necesario conocer los residuos de la molécula blanco que interviene en la unión a su ligando. Por lo tanto, la tecnología de presentación en la superficie de fagos es extremadamente poderosa cuando se compara con los estudios tradicionales de análisis estructural y funcional en una interfaz de unión.

Presentación de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos

Durante la década pasada, la presentación de fragmentos de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos ha constituido el objetivo principal de diversas investigaciones [96, 97]. Como resultado, las bibliotecas combinatorias de anticuerpos expresados en fagos se han convertido en herramientas útiles para el descubrimiento de nuevos fármacos e, incluso, algunos de estos anticuerpos se encuentran en fases avanzadas de ensayos. Aunque la mayoría de las bibliotecas de anticuerpos se han construido mediante la clonación del repertorio inmunitario natural en fagómidos, se han obtenido adelantos importantes en el desarrollo de bibliotecas sintéticas de alta calidad de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) [98].

Los genes de las regiones variables de algunos anticuerpos se han clonado en vectores fagémicos fusionados al gen III de fagos filamentosos. La proteína híbrida creada tiene los dominios de anticuerpo en el extremo amino, seguidos de pIII. Esta proteína se pliega correctamente, es incorporada al fago y conserva las propiedades de unión del anticuerpo soluble original. Cada genoma recombinante de fago contiene el ADN que codifica el anticuerpo específico presentado en su superficie, lo que permite que la partícula de fago que porta el gen del anticuerpo sea seleccionada directamente a partir de las propiedades de unión de la proteína expresada [99]. Estos sistemas se han empleado para expresar fragmentos Fab, scFv y scFv dimericos. Estos últimos difieren de los scFv monoméricos en que el péptido líder tiene una longitud reducida y tienden a asociarse como dímeros.

A pesar de la posibilidad de obtener anticuerpos específicos directamente a partir de repertorios vírgenes presentados en la cápsida de bacteriófagos, otra aplicación importante de esta tecnología es la humanización y la maduración de la afinidad de los anticuerpos murinos convencionales. Estos anticuerpos han demostrado su efectividad en un número significativo de aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado anti-VEGF se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer y otros investigadores han empleado esta tecnología para obtener variantes con potencia y afinidad incrementadas cerca de 100 veces [100].

Conclusiones

La biología moderna debe gran parte de su desarrollo a las bondades de los bacteriófagos. Las aplicaciones en los estudios biológicos clásicos marcaron las pautas para el vuelco de la ingeniería genética en la última década. Las aplicaciones terapéuticas de los fagos se hacen más promisorias para los próximos años como métodos alternativos de incalculable valor, tanto desde el punto de vista clínico como económico.

La tecnología de presentación de péptidos o proteínas en la cápsida de bacteriófagos es una metodología que ha incursionado rápidamente en los campos de la inmunología, la bioquímica de proteínas, la ingeniería de proteínas y la biología celular. Esta tecnología se ha utilizado con el propósito de localizar epítopos, crear mimótopos, identificar antagonistas y agonistas de diferentes moléculas blancas, generar anticuerpos humanos, optimizar la especificidad de los anticuerpos y crear nuevas moléculas con actividades diferentes.

En el campo de las bibliotecas de péptidos, en dependencia del tipo de interacción que se busca con la molécula blanco, el tamaño de los péptidos varía así como su nivel de entropía. Con algunas moléculas blanco las bibliotecas de péptidos que se encuentran constreñidas han funcionado mejor que las lineales. La gran diferencia entre ambos tipos de bibliotecas es que en las lineales el péptido se encuentra libre y puede asumir múltiples conformaciones, de ahí que quizás sean más versátiles en el sentido que para epítomos lineales generalmente se encuentran más clones positivos que cuando se utilizan las bibliotecas constreñidas. La ventaja de las bibliotecas constreñidas es que el péptido no es libre de asumir cualquier conformación, por lo que si se encuentran clones positivos probablemente tendrán mayor afinidad por la molécula blanco que el péptido lineal.

El problema de la utilización de pIII o pVIII como proteína de presentación en los últimos trabajos se ha resumido con la explotación de ambas. Diferentes grupos emplean la multivalencia de pVIII y a partir de las

moléculas seleccionadas construyen nuevas bibliotecas donde se buscan mayores afinidades utilizando la monovalencia de pIII. El uso de estas dos proteínas permite manipular las afinidades de los ligandos seleccionados y mejorar considerablemente la interacción entre moléculas.

A finales de la década de 1990, el problema fundamental que se encuentra para seguir adelante con la búsqueda de nuevas moléculas y con el mejoramiento de las ya existentes, se deriva de los sistemas de selección desarrollados. Es en este punto donde se estancan los resultados obtenidos en la generación de repertorios moleculares. El método de selección ideal es aquel que imita una función biológica determinada que queremos mejorar o bloquear. El diseño de estos receptores *in vitro* está abriendo numerosas posibilidades en este campo. En tal sentido, la utilización de la tecnología de presentación en la superficie de fagos comienza a dar los primeros frutos con la exposición de moléculas receptoras en la cápsida del virus.

- Hankin EH. L'action bactericide des Eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. Ann de l'Inst Pasteur 1896;10:511.
- Twort FW. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. Lancet 1915; 1915II:1241.
- D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bac. dysentériques. Cr r Acad Sci Paris 1917;165:373.
- D'Herelle F. The bacteriophage: its role in immunity. Baltimore: Williams and Wilkins Co./Waverly Press; 1922.
- Brunogogue R, Maisin J. Essais de thérapeutique au motern du bactériophage. C.R.Soc Biol. 1921;85:1120-1.
- Ackerman H, Dubow M. Virus de procarriotas. Propiedades generales de los bacteriófagos. Boca Raton (Florida): CRC Press; 1987.
- Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normak S, Tuomanen E. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. Nature 1999;399:590-3.
- Valdovogel F. New resistance in staphylococcus aureus. N Engl J Med 1999;340:556-7.
- Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. Archivum Immunologiae et therapie experimentalis 2000;48:547-51.
- Merrill CR, Carlton RM, Adhya SL, inventors; Exponential Biotherapies, Inc., assignee. Antibacterial therapy with bacteriophage genotypically modified to delay inactivation by the host defense system. US Patent 5,688,501, 1996.
- Luria SE, Anderson TE. The identification and characterization of bacteriophages with electron microscope. Proc Natl Acad Sci USA 1942;28:127-30.
- Hershey AD, Kalmanson G, Bronfenbrenner J. Quantitative methods in the study of the phage-antiphage reaction. J Immunol 1943;46:267-79.
- Ellis EL, Delbrück M. The growth of bacteriophage. J Gen Physiol 1939;22:365-84.
- Doermann AD. Lysis and lysis inhibition with *Escherichia coli* bacteriophage. J Bacteriol 1948;55:257-75.
- Luria SE, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 1943;28:491.
- Hershey AD. Spontaneous mutations in bacterial viruses. J Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1946;11:33-7.
- Kellenberger E. Cooperativity and regulation through conformational changes as features of phage assembly. Phil Trans Roy Soc Lond 1976B;276:3-13.
- Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J Gen Physiol 1952;36:39-56.
- Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in Salmonella. J Bacteriol 1953; 64:679-9.
- Bertani G, Weigle JJ. Host controlled variation in bacterial viruses. J Bacteriol 1953;65:113.
- Dussoix D, Arber W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda. J Mol Biol 1962;5:37-9.
- Benzer S. On the topology of the genetic fine structure. Proc Natl Acad Sci USA 1959; 45:1607-20.
- Sinsheimer RL. A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage ØX174. J Mol Biol 1959;1:43-54.
- Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature 1961;190:576-581.
- Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. Nature 1961;192:1227-32.
- Meselson M, Weigle M. Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage. Proc Natl Acad Sci USA 1961;47:857-68.
- Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J Mol Biol 1961;3:318-56.
- Ptashne M. Isolation of the lambda phage repressor. Proc Natl Acad Sci USA 1967;57: 232-4.
- Campbell A. Episomes. Adv Genet 1962; 11:101-45.
- Signer ER, Weil J. Recombination in bacteriophage lambda. I. Mutants deficient in general recombination. J Mol Biol 1968;34: 261-1.
- Echols H, Gingery R, Moore L. Integrative recombination function of bacteriophage I: evidence for a site-specific recombination enzyme. J Mol Biol 1968;34:251-60.
- Zimmerman SB, Little JW, Oshinsky CK, Gellert M. Enzymatic joining of DNA strands: a novel reaction of diphosphopyridine nucleotide. Proc Natl Acad Sci USA 1967;57: 1841-8.
- Roberts JW. Termination factor for RNA synthesis. Nature 1969;224:1168-74.
- Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K, Sugino A. Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. Proc Natl Acad Sci USA 1968;59:598-605.
- Gilbert W, Dressler D. DNA replication: the rolling circle model. J Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1968;33:473-84.
- Brutlag DL, Schekman R, Kornberg A. A possible role for RNA polymerase in the initiation of M13 DNA synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 1971;68:2826-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1971;227:680-5.
- Studier FW. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J Mol Biol 1973;2:237-48.
- Georgopoulos CP, Hendrix RW, Casjens SR, Kaiser AD. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. J Mol Biol 1973;76: 45-60.
- Hu S, Ohtsubo E, Davidson N, Saedler H. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among bacterial plasmids: identification and mapping of the insertion sequences IS1 and IS2 in F and R plasmids. J Bacteriol 1975;122:764.
- Godson GN, Fiddes JC, Barrell BG, Sanger F. Comparative DNA sequence analysis of the G4 and 4X 174 genomes. In:

- DT Denhardt D, Dressler, Ray DS, editors. The single stranded DNA phages. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1978. p.51-86.
42. Guarneros G, Hernández T, Mascarenhas D, Montañez C, Schindler D, Schmeissner U, et al. Regulation of the integration-excision reaction by bacteriophage lambda. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1981;45: Pt 1, 439-45.
43. Jacobs WJ, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science 1993;260:819-22.
44. Stacy A, Kelly O, Aubrey L, Vispo NS, Cesareni G, Thomas GJ. Novel tyrosine markers in raman spectra of wild-type and mutant (Y21M and Y24M) FF virions indicate unusual environments for coat protein phenoxyls. Biochemistry 1994;33(5):1037-42.
45. Dulbecco R, inventor; Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc., assignee. Viruses with recombinant surface proteins. US Patent 4,593,002, 1986.
46. Smith G. Filamentous fusion phage: a novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985;228:1315-7.
47. Castagnoli L, Vetrini C, Gonfloni S, Vispo NS, Cesareni G. Selection from a peptide library of the antigenic determinants of a protein. In: Terhorst C, Malavasi F, Albertini A, editors. Generation of antibodies by cell and gene immortalization. Basel: Year Immunol; 1993. p.41-9.
48. Cesareni G. Peptide displays on filamentous phage. A new powerful tool to study protein-ligand interaction. FEBS Lett 1992; 307:66-70.
49. Iannolo G, Minenkova O, Petruzzelli R, Cesareni G. Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein. J Mol Biol 1995;248:835-44.
50. Parmley SF, Smith GP. Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. Gene 1988; 73:305-18.
51. Viera J, Messing J. Production of single stranded plasmid DNA. Meth Enzymol 1987; 153:3-11.
52. Dente L, Cesareni G, Cortese R. pEMBL: a new family of single stranded plasmids. J Nucleic Acids Res 1983;11:1645-55.
53. Cwirla S, Peters E, Barret R, Dower W. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:6378-82.
54. Scott J, Smith G. Searching for peptide ligands with an epitope library. Science 1990;249:38-90.
55. Berzofsky G. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. Science 1985; 229:932-40.
56. Felici F, Puchades Y, Fernández de Cossio ME, Vispo NS. Exposición multivalente utilizando la proteína pVIII de la cápsida de los fagos filamentosos. In: Vispo NS, editor. Biología combinatoria. La Habana: Elfos Scientiae; 2001. En prensa.
57. Vispo NS, Araña MJ, China G, Ojalvo AG, Cesareni G. Characterization of epitopes on human interleukin-2 using phage displayed-peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. Hybridoma 1999;18(3):251-5.
58. Collins J, Röttgen P. Evolutive phage-display—a method as basis for a company. GBF Scientific Annual Report 1997;19-28.
59. Horn N, Vispo NS, Szardenings M, Collins J. Cosmix-Plexing®: un modo novedoso de generar y utilizar bibliotecas combinatorias expuestas en fago. Biotecnología Aplicada 2001.
60. Felici F, Luzzago A, Folgori A, Cortese R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage display libraries. Gene 1993; 128:21-7.
61. Balass M, Heldman Y, Cabilly S, Givol D, Katchalski K, E-Fuchs S. Identification of hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:10638-42.
62. Vispo NS, Felici F, Castagnoli L, Cesareni G. Hybrid-Rop-plll proteins for the display of constrained peptides on filamentous phage capsid. Ann Biol Clin 1993;50:917-22.
63. Nagi A, Reagan L. An inverse correlation between loop length and stability in four helix bundle protein. Fold Des 1997;2:67-75.
64. O'Neil K, Hoess R, Jackson S, Ramachandran N, Mousa S, DeGrado W. Identification of novel peptide antagonist for GPIIb/IIIa from a conformational constrained phage peptide library. Protein Struct Funct Genet 1992;14: 509-15.
65. Luzzago A, Felici F, Tramontano A, Pessi A, Cortese R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage displayed peptide. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptide. Gene 1993;128:51-7.
66. McLafferty M, Kent R, Ladner R, Markland W. M13 bacteriophage displaying disulfide-constrained microproteins. Gene 1993;128: 29-36.
67. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-direct integrins. Biotechnology 1995; 13:265-70.
68. Welply J, Steininger C, Caparon M, Marshall L, Michener M, Howard S, et al. A peptide isolated by phage display binds to ICAM-1 and inhibits to LFA-1. Proteins 1996; 26:262-70.
69. Pierce H, Adey N, Kay B. Identification of cyclized calmodulin antagonist from a phage display random peptide library. Molecular Diversity 1996;1:259-65.
70. Devlin J, Panganiban L, Devlin P. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. Science 1990;249: 404-6.
71. Kay B, Adey N, Manfredi J, Maratagnon A, Fowlkes D. An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. Gene 1993;128:59-65.
72. Webber P, Pantoliano M, Thompson L. Crystal structure and ligands-binding studies of a screened peptide complexed with streptavidin. Biochemistry 1992;31:9350-4.
73. Oldenburg K, Loganathan D, Goldstein I, Schultz P, Gallop M. Peptide ligands for a sugar binding protein isolated from a random peptide library. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:5393-7.
74. Scott J, Loganathan D, Easly R, Gong X, Goldstein I. A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptides epitope library. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89: 5398-402.
75. Folgori A, Tafi R, Felici F, Galfre G, Cortese R, Monaci P, et al. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptides libraries and human sera. EMBO J 1994; 13:2236-43.
76. Prezzi C, Nuzzo M, Meola A, Delmastro P, Galfre G, Cortese R, et al. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. J Immunol 1996;156: 4504-3.
77. Dybward A, Forre O, Kjeldsen-Kragh J, Natvig B, Souid M. Identification of new B cells epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. Eur J Immunol 1993;23:3189-93.
78. Mennuni C, Santini C, Dotta F, Farilla L, Di-Mario U, Fierabracci A, et al. Selection of phage displayed peptides mimicking type 1 diabetes-specific epitopes. J Autoimmun 1996;9: 431-6.
79. Mennuni C, Santini C, Domenico L, Dotta F, Farilla L, Fierabracci A, et al. Identification of a novel type 1 diabetes-specific epitope by screening phage libraries with sera from pre-diabetic patients. J Mol Biol 1997;268: 599-606.
80. de la Cruz V, Lal A, McCutchan T. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. J Biol Chem 1988; 263:4318-22.
81. Greenwood J, Willis A, Perham R. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins as antigen. J Mol Biol 1991; 220:821-7.
82. Willis A, Perham R, Wraith D. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophages. Gene 1993;128:79-83.
83. Minenkova O, Ilyichev A, Kishchenko G, Petrenko V. Design of specific immunogens using filamentous phage as the carrier. Gene 1993;128:85-8.
84. Keller P, Arnold B, Shaw A, Tolman R, van Middlesworth F, Bondy S, et al. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. Virology 1993;193: 709-16.
85. Motti C, Nuzzo M, Meola A, Galfre G, Felici F, Cortese R, et al. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. Gene 1994;146: 191.
86. Orlandi R, Menard S, Colnaghi M, Boyer C, Felici F. Antigenic and immunogenic mimicry of the HER/neu oncoprotein by phage displayed peptides. Europ J Immunol 1994;24: 2868-73.
87. Menéndez T, de Haz I, Delgado M, Garay H, Martín A, Vispo NS. Immunization with phage-displayed variable region 2 from meningococcal PorA outer membrane protein induces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis*. Immunol Lett En prensa.
88. Bass S, Greene R, Wells J. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. Proteins 1990;8:309-14.
89. Lowman H, Wells J. Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. J Mol Biol 1993;234: 564-73.
90. Ultsh M, Somer W, Kossiakoff A, Vos A.

The crystal structure of affinity-matured growth hormone at 2Å resolution. *J Mol Biol* 1994; 227:286-99.

91. Cunningham B, Wells J. Comparison of a structural and functional epitope. *J Mol Biol* 1993;234:554-63.

92. Clackson T, Wells J. A hot spot of binding energy in a hormone receptor interface. *Science* 1995;267:383-6.

93. Novotny J, Brucoleri R, Saul F. On the attribution of binding energy in antigen antibody complexes McPC603, D1.3 and HyHEL-5. *Biochemistry* 1989;28:4735-46.

94. Roberts B. Protease inhibitor display M13

phage: selection of high-affinity neutrophil elastase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2429-33.

95. Vispo NS, Callejo M, Ojalvo AG, Santos A, China G, Gavilondo JV, et al. Displaying human interleukin-2 on the surface of bacteriophage. *Immunotechnology* 1997; 3:185-93.

96. Dall'Acqua W, Carter P. Antibody engineering. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8:443-50.

97. Griffiths AD, Duncan AR. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol* 1998;9: 102-8.

98. Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P,

Fischer M, Wellnhofer G, et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 2000;296:57-86.

99. Hoogenboom H. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *TIBTECH* 1997;5 :62-70.

100. Chen Y, Weismann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, et al. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol* 1999; 293:865-81.

Recibido en mayo de 2001. Aprobado en junio de 2001.

IX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

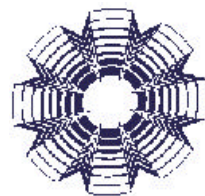
Veracruz, septiembre 10-14 del 2001

Aspectos básicos,
aplicaciones industriales
y políticas en todos los campos
de la biotecnología y la bioingeniería

Los interesados en presentar trabajos libres,
deben enviar los resúmenes antes del 23 de marzo del 2001.

Los trabajos se seleccionarán por el Comité Científico
en base a su originalidad, relevancia, interés y calidad científica.

Las empresas, instituciones y proveedores de bienes y servicios
relacionados con la biotecnología y la bioingeniería
podrán participar como patrocinadores y/o expositores



SMBB
Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López Presidente del Comité Organizador Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN Norte 87-B No. 57, Col. Clavería, México D.F. C.P. 2080, México Tel.: (52-5) 5729-6000 ext. 62459 Fax: (52-5) 5396-3503	Dr. Mariano García Garibay Presidente del Comité Científico Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa, Dpto. de Biotecnología Ave. Michoacán y La Purísima s/n Col. Vicentina, México D.F. C.P. 9340, México Fax: (52-5) 5804-4712	Oficina de la SMBB Diagonal de San Antonio 1810 Piso 1, Oficina 1 Col. Narvarte, México D.F. C.P. 03020 México Tel.: (52-5) 5538-5815 Fax: (52-5) 5538-5815 E-mail: smbb@prodigy.net.mx
--	--	--

www.smbb.org.mx