

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 555**

51 Int. Cl.:

C12N 15/81 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04796313 .7**

96 Fecha de presentación: **22.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1678314**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Métodos para la síntesis de polipéptidos hetero-multiméricos en levaduras usando una estrategia de apareamiento haploide.**

30 Prioridad:

22.10.2003 US 513876 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

26.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

26.12.2012

73 Titular/es:

**KECK GRADUATE INSTITUTE (50.0%)
535 WATSON DRIVE
CLAREMONT, CA 91711, US y
ALDER BIOPHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CREGG, JAMES M.;
LATHAM, JOHN;
LITTON, MARK;
SCHATZMAN, RANDALL y
TOLSTORUKOV, ILYA I.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 555 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

Métodos para la síntesis de polipéptidos hetero-multiméricos en levaduras usando una estrategia de apareamiento haploide.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La producción de proteína recombinante es una actividad esencial para la selección de alto rendimiento, la validación funcional, la biología estructural, y la producción de polipéptidos farmacéuticos. *Escherichia coli* es un organismo ampliamente utilizado para la expresión de proteínas heterólogas debido a que crece fácilmente a una densidad celular elevada en sustratos poco costosos, y tiene técnicas genéticas y vectores de expresión bien establecidos. Sin embargo, esto no siempre es suficiente para la producción eficaz de biomoléculas activas. Para
10 que sean biológicamente activas, las cadenas de polipéptidos tienen que plegarse en la estructura tridimensional nativa correcta, incluyendo la formación apropiada de enlaces disulfuro, y además se puede requerir la correcta asociación de múltiples cadenas.

Aunque el estado activo de la proteína puede estar favorecido termodinámicamente, la escala temporal para el plegamiento puede variar desde milisegundos a días. Se introducen barreras cinéticas, por ejemplo, por la
15 necesidad de alineación de subunidades y subdominios. Y particularmente con proteínas eucariotas, deben tener lugar reacciones covalentes para que se forme la proteína correctamente plegada. Los últimos tipos de reacción incluyen la formación de enlaces disulfuro, la isomerización cis/trans de la cadena polipeptídica alrededor de los enlaces peptídicos de prolina, el procesamiento de la preproteína y la ligación de los grupos prostéticos. Estas limitaciones cinéticas pueden dar lugar a la acumulación de intermedios parcialmente plegados que contienen
20 superficies "adherentes" hidrófobas expuestas que promueven la auto-asociación y la formación de agregados.

Los anticuerpos son proteínas tetraméricas, que tienen muchos usos en el diagnóstico clínico y la terapia. Cada tetrámero de anticuerpo se compone de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Los anticuerpos humanos o humanizados puros de un tipo específico son difíciles o imposibles de purificar de fuentes naturales en cantidades suficientes para muchos propósitos. Como consecuencia de ello, las empresas de
25 biotecnología y farmacéuticas han recurrido a métodos recombinantes basados en ADN para prepararlos a gran escala. La producción de anticuerpos funcionales requiere no sólo la síntesis de los dos polipéptidos, sino también una serie de modificaciones post-traduccionales, incluyendo el procesamiento proteolítico de la secuencia señal de secreción N-terminal; el plegamiento apropiado y el ensamblaje de los polipéptidos en tetrámeros; la formación de enlaces disulfuro; y la N-glicosilación específica. Todos estos eventos tienen lugar en la ruta secretora de la célula eucariota, un orgánulo complejo exclusivo de las células eucariotas.
30

La síntesis recombinante de tales proteínas complejas ha tenido que depender de sistemas basados en el cultivo de tejidos de eucariotas superiores para el material biológicamente activo. Sin embargo, los sistemas de producción basados en cultivo de tejidos de mamíferos son significativamente más caros y complicados que los métodos de fermentación microbiana. Además, sigue habiendo cuestiones referentes a los productos terapéuticos producidos
35 usando materiales derivados de subproductos animales.

Como eucariota, *Pichia pastoris* tiene muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de eucariotas superiores tales como el procesamiento de proteínas, el plegamiento de proteínas, y la modificación postraduccionales, a la vez que es tan fácil de manipular como *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Es más rápido, más fácil, y menos costoso de usar que otros sistemas de expresión eucariotas, tales como baculovirus o cultivos de tejidos de mamíferos, y
40 generalmente produce mayores niveles de expresión. Como levadura, comparte las ventajas de las manipulaciones genéticas y moleculares con *Saccharomyces*. Estas características hacen que *Pichia* sea muy útil como sistema de expresión de proteínas.

Muchas de las técnicas desarrolladas para *Saccharomyces* se pueden aplicar a *Pichia*. Éstas incluyen la transformación por complementación; la interrupción génica y la sustitución génica. Además, la nomenclatura genética utilizado para *Saccharomyces* se ha aplicado a *Pichia*. También hay complementación cruzada entre productos génicos tanto en *Saccharomyces* como en *Pichia*. Varios genes de tipo salvaje de *Saccharomyces* complementan genes mutantes comparables en *Pichia*.
45

La expresión heteróloga en *Pichia pastoris* puede ser intracelular o secretada. La secreción requiere la presencia de una secuencia señal en la proteína expresada para dirigirla a la ruta secretora. Si bien se han utilizado con éxito varias secuencias diferentes de la señal de secreción, incluyendo la señal de secreción nativa presente en algunas proteínas heterólogas, el éxito ha sido variable. Una ventaja potencial para la secreción de proteínas heterólogas es que *Pichia pastoris* secreta muy bajos niveles de proteínas nativas. Eso, combinado con la muy baja cantidad de proteína en el medio de crecimiento de *Pichia* mínimo, significa que la proteína heteróloga secretada comprende la gran mayoría de la proteína total en el medio y sirve como el primer paso en la purificación de la proteína.
50

Muchas especies de levadura, incluyendo *Pichia*, son competentes para el apareamiento. Esto permite que dos cepas haploides distintas se apareen naturalmente y generen una especie diploide que posee dos copias cromosómicas.
55

5 A pesar de que *P. pastoris* se ha utilizado con éxito para la producción de diversas proteínas heterólogas, por ejemplo, el antígeno de superficie de la hepatitis B (Cregg et al. (1987) *Bio/Technology* 5:479), la lisozima y la invertasa (Digan et al. (1988) *Dev. Indust. Micro* 29:59. Tschopp et al. (1987) *Bio/Technology* 5:1305), los esfuerzos para producir otros productos de genes heterólogos en *Pichia*, especialmente mediante secreción, han dado resultados mixtos. En el nivel actual de conocimiento del sistema de expresión de *P. pastoris*, es impredecible que un gen dado pueda ser expresado a un nivel apreciable en esta levadura o que *Pichia* tolere la presencia del producto del gen recombinante en las células. Además, es especialmente difícil prever si una proteína en particular será secretada por *P. pastoris*, y si lo fuera, con qué eficacia.

10 El documento WO 00/23579 describe la producción de anticuerpo monoclonal recombinante mediante transformación de una única cepa de levadura haploide de *P. pastoris* haploide con genes de inmunoglobulina de ratón/humana que codifican las cadenas pesadas y ligeras.

El documento US-A-6.306.625 ilustra la transformación de diferentes cepas de levadura de *S. cerevisiae* haploides con vectores de expresión que codifican partículas mixtas del antígeno de superficie de la hepatitis B.

15 En el documento WO 03/018761, se propone la posibilidad de aparear una primera población de células de levadura que portan un vector de expresión con una segunda población de células de levadura que portan otro vector de expresión.

Blaise et al., *Gene*, Vol. 342, págs. 211-218, 2004, hacen referencia a la expresión de fragmentos de anticuerpo Fab de múltiples cadenas sobre la superficie de cepas de levadura, tales como *Pichia*.

20 El documento US-A-6.204.023 describe anfitriones de levadura transformados para la producción de moléculas de inmunoglobulina quiméricas o fragmentos o derivados de los mismos.

La presente invención proporciona métodos mejorados para la secreción de heteromultímeros heterólogos a partir de especies de levadura de *Pichia* competentes para el apareamiento.

COMPENDIO DE LA INVENCION

25 Se proporcionan métodos para la síntesis y secreción de proteínas hetero-multiméricas recombinantes en la levadura *Pichia* competente para el apareamiento. Las proteínas hetero-multiméricas de interés comprenden al menos dos cadenas de polipéptidos no idénticas, por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, cadenas alfa y beta del MHC; y similares. Se proporciona un vector de expresión para cada cadena de polipéptido no idéntica.

30 Cada vector de expresión se transforma en una célula de levadura de *Pichia* haploide. En algunas realizaciones de la invención, la célula de levadura haploide está marcada genéticamente, donde la célula de levadura haploide es una de un par complementario. Un primer vector de expresión es transformado en una célula haploide y un segundo vector de expresión es transformado en una segunda célula haploide. Cuando las células haploides se van a aparear, esto será a través de la fusión genética directa, o se induce un evento similar con fusión de esferoplastos.

35 Los niveles de expresión de los polipéptidos no idénticos en las células haploides se pueden calibrar individualmente, y ajustar a través de la selección apropiada, el número de copias del vector, la potencia y/o la inducción del promotor y similares. En una realización de la invención, el promotor en cada vector de expresión es diferente. En otra realización de la invención, se proporciona para cada uno el mismo promotor. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles.

40 Las células haploides transformadas, que sintetizan cada una individualmente un polipéptido no idéntico, se identifican y luego se cruzan genéticamente o se fusionan. Las cepas diploides resultantes se utilizan para producir y secretar la proteína hetero-multimérica completamente ensamblada y biológicamente funcional. La metodología diploide permite optimizar el apareamiento de subunidades para mejorar la generación y la secreción del producto completo.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

45 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

50 Figuras 1A-1D. Generación de anticuerpo recombinante completo ensamblado. Se utilizó la metodología de detección por inmunotransferencia para caracterizar las cepas *Pichia* haploides parentales, que producían cada una una subunidad del anticuerpo y la cepa diploide diana que producía las dos subunidades que forman el anticuerpo totalmente ensamblado. Las cepas de levadura mostradas en la Figura 1A muestran un cultivo estático de cada una de las cepas representativas, donde la parte superior son las distintas cepas haploides que contienen las subunidades de las cadenas pesadas (H) y ligera (L) respectivamente; la parte inferior la diploide apareada estable que produce ambas subunidades. La Figura 1B muestra la detección selectiva de la cadena H, que se encuentra solamente en la cadena H parental haploide, y la diploide apareada que contiene tanto H como L. La Figura 1C muestra la detección general de las cadenas H y L, que establece que la producción de proteína es activa en las tres

cepas. La Figura 1D muestra la detección selectiva en la cepa diploide del anticuerpo correctamente completo ensamblado, lo que confirma que solo el sistema diploide es capaz de generar anticuerpos totalmente ensamblados.

Figura 2. Producción de anticuerpo completo en *Pichia pastoris*. Se llevó a cabo la expresión heteróloga del anticuerpo completo utilizando una cepa de *Pichia pastoris* diploide. La proteína de anticuerpo exportada se aisló del medio acondicionado utilizando cromatografía de afinidad con Proteína A. Se muestra una alícuota de la fracción del pico. El patrón de IgG humana se obtuvo de IgG purificada humana agrupada.

Figura 3. El anticuerpo ensamblado fue detectado y caracterizado a partir de los sobrenadantes del medio de subclones de cepas de *Pichia pastoris* diploides, que fueron diseñadas para producir el anticuerpo quimérico de ratón/humano completo. Las placas de microtitulación se recubrieron con anticuerpos selectivos anti-Fc humano para capturar el anticuerpo del medio de cultivo. El anticuerpo correctamente ensamblado se detectó mediante el uso de un (Fab')₂ selectivo humano, que reconoce las regiones constantes de la cadena pesada CH1 y ligera κ. Se aplicaron a la placa diluciones seriadas de medio aclarado. El revelado se realizó por medio de métodos de visualización de ELISA convencionales. La detección es selectiva, como se demuestra por la falta de cualquier señal detectable en el patrón de mIgG.

Figura. 4. *Pichia* generó manchas de anticuerpos recombinantes CD3 que contenían células T Jurkat, así como anticuerpos tradicionales derivados de mamíferos. Las células T Jurkat se inmovilizaron sobre portaobjetos de vidrio y se llevó a cabo la tinción utilizando el anticuerpo anti-CD3 generado en levaduras y células de mamífero. La detección se realizó utilizando un anticuerpo secundario anti-roedor conjugado con biotina, y se reveló con un derivado de HRP-estreptavidina. Las imágenes son el campo del portaobjetos representativo tratado con cada anticuerpo recombinante. El fondo es el control para el revelado y se realiza en ausencia del anticuerpo anti-CD3 primario.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

Las proteínas hetero-multiméricas recombinantes son secretadas a partir de cepas diploides de la levadura *Pichia* competente para el apareamiento. Un par de células haploides de levadura *Pichia* marcadas genéticamente son transformadas con vectores de expresión que comprenden subunidades de la proteína heteromultimérica. Una célula haploide comprende un primer vector de expresión, y una segunda célula haploide comprende un segundo vector de expresión. Opcionalmente, se pueden introducir vectores de expresión adicionales en las células haploides o diploides; o el primer o el segundo vectores de expresión pueden comprender secuencias codificantes adicionales; para la síntesis de heterotrímeros; heterotetrámeros; etc. Los niveles de expresión de los polipéptidos no idénticos se pueden calibrar individualmente, y ajustar a través de la selección apropiada, el número de copias del vector, la potencia y/o la inducción del promotor y similares. Las células haploides transformadas se cruzan genéticamente o se fusionan. Las cepas diploides o tetraploides resultantes se utilizan para producir y secretar la proteína heteromultimérica completamente ensamblada y biológicamente funcional.

El uso de células diploides o tetraploides para producción de proteínas proporciona beneficios inesperados. Las células se pueden cultivar con fines productivos, es decir, aumento a escala, y durante períodos de tiempo prolongados, en condiciones que pueden ser perjudiciales para el crecimiento de las células haploides, cuyas condiciones pueden incluir alta densidad celular; crecimiento en medio mínimo; crecimiento a bajas temperaturas; crecimiento estable en ausencia de presión selectiva; y que puede proporcionar un mantenimiento de la integridad de la secuencia génica heteróloga y el mantenimiento de altos niveles de expresión con el tiempo. Estos beneficios pueden surgir, al menos en parte, de la creación de cepas diploides a partir de dos cepas haploides parentales distintas. Estas cepas haploides pueden incluir numerosas mutaciones autótrofas menores, cuyas mutaciones están complementadas en las diploides o tetraploides, permitiendo el crecimiento bajo condiciones altamente selectivas.

DEFINICIONES

Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las especies o los géneros animales, y los reactivos concretos descritos, que pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria solo tiene el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Según se utilizan en la presente memoria las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "la proteína" incluye la referencia a una o más proteínas y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comprendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención a menos que claramente se indique lo contrario.

Especies de levadura competentes para el apareamiento. Tales especies de levadura existen en una forma haploide y diploide. Las células diploides pueden, bajo condiciones apropiadas, proliferar durante un número indefinido de generaciones en forma diploide. Las células diploides también puede esporular para formar células haploides.

Además, el apareamiento sucesivo puede dar como resultado cepas tetraploides a través de apareamiento adicional de las diploides auxótrofas.

De acuerdo con la invención, la levadura competente para el apareamiento es un miembro del género *Pichia*.

5 El género *Pichia* tiene un interés particular. *Pichia* comprende varias especies, incluyendo las especies *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, y *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). La más preferida es la especie *Pichia pastoris*.

Célula de Levadura Haploide: Una célula que tiene una única copia de cada gen de su complemento genómico normal (cromosómico).

10 *Célula de Levadura Diploide*: Una célula que tiene dos copias (alelos) de cada gen de su complemento genómico normal, formado típicamente por el procedimiento de fusión (apareamiento) de dos células haploides.

15 *Célula de Levadura Tetraploide*. Una célula que tiene cuatro copias (alelos) de cada gen de su complemento genómico normal, formado típicamente por el procedimiento de fusión (apareamiento) de dos células haploides. Los tetraploides pueden llevar dos, tres, o cuatro casetes diferentes. Tales tetraploides se podrían obtener en *Pichia* por el apareamiento sucesivo de dos haploides para obtener diploides auxótrofos. Por ejemplo, un haploide [met his] se puede aparear con un haploide [ade his] para obtener un diploide [his]; y un haploide [met arg] se puede aparear con un haploide [ade arg] para obtener un diploide [arg]; a continuación el diploide [his] x el diploide [arg] para obtener un tetraploide protótrofo. Los expertos en la técnica entenderán que la referencia a los beneficios y usos de las células diploides también pueden aplicarse a las células tetraploides.

20 *Apareamiento de Levadura*: El procedimiento mediante el cual dos células de levadura haploides se fusionan naturalmente para formar una célula de levadura diploide.

Meiosis: El procedimiento mediante el cual una célula de levadura diploide sufre división reductiva para formar cuatro productos de esporas haploides. Cada espora puede germinar después y formar una línea celular de crecimiento vegetativo haploide.

25 *Marcador Seleccionable*: Un marcador seleccionable es un gen o fragmento de gen que confiere un fenotipo de crecimiento (característica de crecimiento físico) a una célula que recibe ese gen, por ejemplo a través de un evento de transformación. El marcador seleccionable permite a la célula sobrevivir y crecer en un medio de crecimiento selectivo en condiciones en las que las células que no reciben ese gen marcador seleccionable no pueden crecer. Los genes marcadores seleccionables generalmente se dividen en varios tipos, incluyendo los genes marcadores seleccionables positivos tales como un gen que confiere a una célula resistencia a un antibiótico u otro fármaco, a temperatura cuando dos mutantes ts se cruzan o un mutante ts se transforma; genes marcadores seleccionables negativos tales como un gen biosintético que confiere a una célula la capacidad de crecer en un medio sin un nutriente específico necesario para todas las células que no tienen ese gen biosintético, o un gen biosintético mutagenizado que confiere a la célula la incapacidad para crecer por células que no tienen el gen de tipo salvaje, y similares. Los marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a: ZEO; G418; HIS 5; LYS3; MET1; MET3a; ADE1; ADE3; URA3; y similares.

30 *Vector de Expresión*: Estas especies de ADN contienen elementos que facilitan la manipulación de la expresión de una proteína foránea en el interior de una célula anfitriona diana. Convenientemente, la manipulación de las secuencias y la producción de ADN para la transformación se realiza primero en un anfitrión bacteriano, por ejemplo, *E. coli* y los vectores generalmente incluirán secuencias para facilitar tales manipulaciones, incluyendo un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección bacteriana apropiado. Los marcadores seleccionables codifican proteínas necesarias para la supervivencia o el crecimiento de las células anfitrionas transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células anfitrionas no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, (b) complementan deficiencias auxótrofas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos.

35 Los vectores de expresión para su uso en los métodos de la invención incluirán adicionalmente secuencias específicas de levadura, incluyendo un marcador auxótrofo seleccionable o de fármaco para la identificación de cepas de levadura transformadas. Se puede utilizar adicionalmente un marcador de fármaco para amplificar el número de copias del vector en una célula anfitriona de levadura.

40 La secuencia codificante del polipéptido de interés está conectada operablemente a secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción que proporcionan la expresión del polipéptido en células de levadura. Estos componentes del vector pueden incluir, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: un elemento intensificador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. También se pueden incluir secuencias para la secreción del polipéptido, por ejemplo, una secuencia de señal, y similares. Es opcional un origen de replicación de levadura, ya que los vectores de expresión a menudo se integran en el genoma de la levadura.

55

En una realización de la invención, el polipéptido de interés está conectado operablemente, o fusionado, a secuencias que proporcionan la secreción optimizada del polipéptido a partir de células diploides de levadura *Pichia*.

Los ácidos nucleicos están "conectados operablemente" cuando se colocan en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal está conectado operablemente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está conectado operablemente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia. Generalmente, "conectado operablemente" significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que ser contiguos. La conexión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes o, alternativamente, a través de un método de PCR/recombinación familiar para los expertos en la técnica (Gateway[®] Technology; Invitrogen, Carlsbad California). Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Los promotores son secuencias no traducidas localizadas aguas arriba (5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente en aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia de ácido nucleico concreta a la que están conectadas operablemente. Tales promotores se dividen en varias clases: promotores inducibles, constitutivos, y reprimibles que aumentan los niveles de transcripción en respuesta a la ausencia de un represor. Los promotores inducibles pueden iniciar niveles crecientes de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

El fragmento promotor de levadura también puede servir como sitio para la recombinación homóloga y la integración del vector de expresión en el mismo sitio en el genoma de la levadura, como alternativa, se utiliza un marcador seleccionable como sitio para la recombinación homóloga. La transformación de *Pichia* es descrita por Cregg et al. (1985) en Mol. Cell. Biol. **5**:3376-3385.

Los ejemplos de los promotores adecuados de *Pichia* incluyen el promotor AOX1 (Cregg et al. (1989). Mol. Cell. Biol. **9**:1316-1323); el promotor ICL1 (Menéndez et al (2003). Yeast **20** (13):1097-108); el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) (Waterham et al. (1997) Gene **186**(1):37-44), y el promotor FLD1 (Shen et al. (1998) Gene **216**(1):93-102). El promotor GAP es un promotor constitutivo fuerte y los promotores son AOX y FLD1 inducibles.

Los polipéptidos de interés pueden producirse de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, por ejemplo, una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en extremo N de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte de la secuencia codificante del polipéptido que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que es reconocida y procesada a través de una de las rutas convencionales disponibles en la célula anfitriona. La señal pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* ha demostrado ser eficaz en la secreción de una variedad de proteínas recombinantes de *P. pastoris*. Las señales de secreción de interés también incluyen secuencias señal de mamífero, que pueden ser heterólogas para la proteína que está siendo secretada, o puede ser una secuencia nativa de la proteína que está siendo secretada. Las secuencias señal incluyen secuencias pre-péptido, y en algunos casos pueden incluir secuencias propéptido. Muchas de tales secuencias señal son conocidas en la técnica, incluyendo las secuencias señal encontradas en cadenas de inmunoglobulina, por ejemplo, la secuencia de preprotoxina K28, PHA-E, FACE, MCP-1 humana, secuencias señal de albúmina de suero humana, cadena pesada de Ig humana, cadena ligera de Ig humana, y similares. Por ejemplo, véase Hashimoto et al. Protein Eng. **11**(2) 75 (1998); y Kobayashi et. al. Therapeutic Apheresis **2**(4) 257 (1998).

La transcripción se puede incrementar mediante la inserción de una secuencia activadora de la transcripción en el vector. Estos activadores son elementos que actúan en cis de ADN, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los intensificadores transcripcionales son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose hallado en 5' y 3' con respecto a la unidad de transcripción, dentro de un intrón, así como dentro de la propia secuencia codificante. El intensificador puede empalmarse en el vector de expresión en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células anfitrionas eucariotas también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles comúnmente 3' con respecto al codón de terminación de la traducción, en las regiones no traducidas de los ADN eucariotas o virales o de los ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas de ligación convencionales o métodos de PCR/recombinación. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN son escindidos, adaptados, y religados en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos o por medio de métodos de recombinación. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en

los plásmidos construidos, se utilizan las mezclas de ligación para transformar las células anfitrionas, y se seleccionan los transformantes satisfactorios mediante resistencia a antibióticos (por ejemplo ampicilina o Zeocina) cuando sea apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, se analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción y/o se secuencian.

- 5 Como alternativa a la restricción y ligación de fragmentos, se pueden utilizar métodos de recombinación basado en sitios att y enzimas de recombinación para insertar secuencias de ADN en un vector. Tales métodos son descritos, por ejemplo, por Landy (1989) Ann. Rev. Biochem. 58:913-949; y son conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos utilizan la recombinación de ADN intermolecular que está mediada por una mezcla de proteínas recombinación codificadas por lambda y *E. coli*. La recombinación tiene lugar entre los sitios de anclaje específicos (att) en las moléculas de ADN que interactúan. Para obtener una descripción de los sitios att véase Weisberg y Landy (1983) Site-Specific Recombination in Phage Lambda, in *Lambda II*, Weisberg, ed. (Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Press), págs. 211 -250. Los segmentos de ADN que flanquean los sitios de recombinación se cambian, de manera que después de la recombinación, los sitios att son secuencias híbridas que comprenden secuencias donadas por cada vector parental. La recombinación se puede producir entre los ADN de cualquier topología.

Los sitios att se pueden introducir en una secuencia de interés mediante ligación de la secuencia de interés en un vector apropiado; generando un producto de PCR que contiene sitios att B mediante el uso de cebadores específicos; generando una biblioteca de ADNc clonada en un vector apropiado que contiene sitios att; y similares.

- 20 *Plegamiento*, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la estructura tridimensional de los polipéptidos y las proteínas, donde las interacciones entre los residuos de aminoácidos actúan estabilizando la estructura. Aunque las interacciones no covalentes son importantes para la determinación de la estructura, por lo general las proteínas de interés tendrán enlaces disulfuro covalentes intra y/o intermoleculares formados por dos residuos de cisteína. Para las proteínas y los polipéptidos de origen natural o derivados o variantes de los mismos, el plegamiento correcto es normalmente la disposición que da lugar a una actividad biológica óptima, y puede ser convenientemente verificado por medio de análisis para determinar la actividad, por ejemplo, la actividad de unión al ligando, enzimática, etc.

En algunos casos, por ejemplo cuando el producto deseado es de origen sintético, los ensayos basados en la actividad biológica serán menos significativos. El plegamiento correcto de dichas moléculas se puede determinar sobre la base de las propiedades físicas, las consideraciones energéticas, los estudios de modelización, y similares.

- 30 El anfitrión para la expresión puede modificarse adicionalmente mediante la introducción de secuencias que codifican una o más enzimas que mejoran el plegamiento y la formación de enlaces disulfuro, es decir, foldasas chaperoninas, etc. Tales secuencias pueden ser expresadas constitutivamente o induciblemente en la célula anfitriona de levadura, utilizando vectores, marcadores, etc., como es conocido en la técnica. Preferiblemente, las secuencias, que incluyen elementos reguladores de la transcripción suficientes para el patrón de expresión deseado, se integran establemente en el genoma de la levadura a través de una metodología específica.

- 35 Por ejemplo, la PDI eucariótica no es sólo un catalizador eficaz de la oxidación de la cisteína de las proteínas y de la isomerización de enlaces disulfuro, sino que también exhibe actividad chaperona. La expresión simultánea de PDI puede facilitar la producción de proteínas activas que tienen múltiples enlaces disulfuro. También tiene interés la expresión de BIP (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina); ciclofilina, y similares. En una realización de la invención, cada una de las cepas parentales haploides expresa una enzima de plegamiento distinta, por ejemplo, una cepa puede expresar BIP, y la otra cepa puede expresar PDI.

- 40 Los términos "*proteína deseada*" o "*proteína diana*" se utilizan indistintamente y se refieren en general a cualquier proteína secretada que tiene 2 o más cadenas de polipéptidos no idénticas, donde tales cadenas se sintetizan de forma independiente, es decir, no como resultado de la escisión post-traducciona de una única cadena polipeptídica. Los polipéptidos son heterólogos, es decir, foráneos para la levadura. Preferiblemente, se utilizan polipéptidos de mamífero, es decir, polipéptidos codificados en un genoma de mamífero.

- 45 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo. El término "anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molecular que contenga una cadena de polipéptido con una forma específica que se adapte a y reconozca un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. La molécula de anticuerpo arquetipo es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc., de todas las fuentes, por ejemplo, humano, roedor, conejo, vaca, oveja, cerdo, perro, otros mamíferos, pollo, otras aves, etc., se considera que son "anticuerpos". Se han descrito numerosas secuencias codificantes de anticuerpos; y se pueden originar otras por medio de métodos bien conocidos en la técnica.

- 55 Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno mediante ingeniería genética. En esta técnica, como con otros métodos, las células productoras de anticuerpos son sensibilizadas al antígeno o inmunógeno deseado. El ARN mensajero aislado de las células productoras de anticuerpos se usa como molde para elaborar ADNc utilizando la amplificación por PCR. Se produce una genoteca de vectores, que contienen cada uno

un gen de la cadena pesada y un gen de la cadena ligera que conservan la especificidad inicial para el antígeno, mediante la inserción de secciones apropiadas del ADNc amplificado de la inmunoglobulina en los vectores de expresión. Se construye una genoteca combinatoria combinando la genoteca de genes de la cadena pesada con la genoteca de genes de la cadena ligera. Esto da como resultado una genoteca de clones que expresan simultáneamente una cadena pesada y una ligera (que se asemeja al fragmento Fab o fragmento de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo). Los vectores que llevan estos genes se transfectan simultáneamente en una célula anfitriona. Cuando se induce la síntesis del gen del anticuerpo en el anfitrión transfectado, las proteínas de la cadena pesada y ligera se autoensamblan para producir anticuerpos activos que pueden ser detectados mediante escrutinio con el antígeno o inmunógeno.

Las secuencias codificantes de anticuerpos de interés incluyen las codificadas por las secuencias nativas, así como ácidos nucleicos que, en virtud de la degeneración del código genético, tienen una secuencia idéntica a la de los ácidos nucleicos descritos, y sus variantes. Los polipéptidos variantes pueden incluir sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos (aa). Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas o sustituciones para eliminar los aminoácidos no esenciales, por ejemplo para alterar un sitio de glicosilación, o para minimizar el plegamiento incorrecto por medio de sustitución o deleción de uno o más residuos de cisteína que no son necesarios para la función. Las variantes pueden ser diseñadas para que retengan o tengan una mayor actividad biológica de una región concreta de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional, residuos de aminoácidos catalíticos, etc.). Las variantes también pueden incluir fragmentos de los polipéptidos descritos en la presente memoria, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales. Las técnicas para la mutagénesis in vitro de genes clonados son conocidas. También se incluyen en la presente invención polipéptidos que han sido modificados utilizando técnicas comunes de biología molecular para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agente terapéutico.

Se pueden elaborar anticuerpos quiméricos mediante métodos recombinantes por medio de combinación de regiones de la cadena pesada y ligera variables (VK y VH), obtenidas a partir de células productoras de anticuerpos de una especie con las regiones de la cadena ligera y pesada constantes de otra. Los anticuerpos quiméricos típicamente utilizan regiones variables de roedor o conejo y regiones constantes humanas, con el fin de producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. La producción de tales anticuerpos quiméricos es bien conocida en la técnica, y se puede lograr mediante métodos convencionales (como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.659).

Los anticuerpos humanizados se diseñan para que contengan incluso más dominios de inmunoglobulina de tipo humano, e incorporan únicamente las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de un animal. Esto se logra examinando cuidadosamente la secuencia de los bucles hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal, y ajustándolas a la estructura de las cadenas de anticuerpos humanos. Aunque aparentemente complejo, el proceso es sencillo en la práctica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos Núm 6.187.287.

Además de las inmunoglobulinas completas (o sus contrapartes recombinantes), se pueden sintetizar fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión de epítipo (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, u otros fragmentos). Se pueden diseñar "fragmentos", o inmunoglobulinas mínimas utilizando técnicas de inmunoglobulinas recombinantes. Por ejemplo se pueden producir inmunoglobulinas "Fv" para su uso en la presente invención mediante la síntesis de una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. Las combinaciones de anticuerpos también tienen interés, por ejemplo, diacuerpos, que comprenden dos especificidades Fv diferentes.

Las inmunoglobulinas pueden ser modificadas después de la traducción, por ejemplo, para añadir conectores químicos, radicales detectables, tales como colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, radicales quimioluminiscentes y similares, o se pueden utilizar radicales de unión específica, tales como estreptavidina, avidina o biotina, y similares en los métodos y composiciones de la presente invención.

MÉTODOS DE SÍNTESIS DE POLIPÉPTIDOS

Las células de levadura de *Pichia* haploides competentes para el apareamiento transformadas proporcionan un método genético que permite el emparejamiento de subunidades de una proteína deseada. Las cepas de levadura de *Pichia* haploides se transforman con cada uno de los dos vectores de expresión, un primer vector para dirigir la síntesis de una cadena polipeptídica y un segundo vector para dirigir la síntesis de una segunda cadena polipeptídica, no idéntica. Las dos cepas de *Pichia* haploides se aparean para proporcionar un anfitrión diploide donde en el que se puede obtener una producción optimizada de la proteína diana.

Opcionalmente, se proporcionan una o varias secuencias codificantes no idénticas adicionales. Tales secuencias pueden estar presentes en vectores de expresión adicionales o en el primero o el segundo vectores de expresión. Como es conocido en la técnica, se pueden expresar independientemente múltiples secuencias codificantes de promotores individuales; o se pueden expresar coordinadamente a través de la inclusión de un "sitio interno de entrada al ribosoma" o "IRES", que es un elemento que promueve entrada directa al interior del ribosoma del codón de iniciación, tal como ATG, de un cistrón (una región que codifica la proteína), lo que conduce a la traducción del

gen independiente de cap. Los elementos IRES funcionales en levadura son descritos por Thompson et al. (2001) P.N.A.S. 98:12866-12868.

5 En una realización de la invención, se producen secuencias de anticuerpo combinadas con una cadena J secretora, que proporciona una estabilidad mejorada de IgA (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.959.177; y 5.202.422).

10 Cada una de las dos cepas de levadura haploides es auxótrófa, y requiere un suplemento del medio para el crecimiento de las células haploides. El par de auxótrofos es complementario, de manera que el producto diploide crecerá en ausencia de los suplementos necesarios para las células haploides. Se conocen muchos de tales marcadores genéticos en levaduras, incluyendo los requerimientos de aminoácidos (por ejemplo, *met*, *lys*, *his*, *arg*, etc), nucleósidos (por ejemplo, *ura3*, *ade1*, etc.); y similares. Se pueden preferir marcadores de aminoácidos para los métodos de la invención.

15 Las dos células haploides transformadas se pueden cruzar genéticamente y se pueden seleccionar cepas diploides derivadas de este evento de apareamiento por sus requerimientos nutricionales híbridos. Alternativamente, las poblaciones de las dos cepas haploides transformadas se convierten en esferoplastos y se fusionan, y la progenie diploide se regenera y se selecciona. Mediante cualquier método, se pueden identificar las cepas diploides y se pueden hacer crecer selectivamente porque, a diferencia de sus parentales haploides, no tienen los mismos requerimientos nutricionales. Por ejemplo, las células diploides se pueden cultivar en un medio mínimo. La estrategia de síntesis diploide tiene ciertas ventajas. Las cepas diploides tienen el potencial de producir niveles mejorados de proteína heteróloga a través de una complementación más amplia de las mutaciones subyacentes, que puede afectar a la producción y/o la secreción de la proteína recombinante.

20 En una realización de la invención, cada una de las cepas haploides de *Pichia* se transforma con una genoteca de polipéptidos, por ejemplo, una genoteca de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos. Las células haploides transformadas que sintetizan los polipéptidos se aparean con las células haploides complementarias. Las células diploides resultantes se seleccionan para determinar la proteína funcional. Las células diploides proporcionan un medio para reunir rápida, conveniente y económicamente un gran número de combinaciones de polipéptidos para las pruebas funcionales. Esta tecnología es especialmente aplicable para la generación de productos de proteínas heterodiméricas, donde los niveles de síntesis de subunidades optimizados son críticos para la expresión y la secreción de la proteína funcional.

25 En otra realización de la invención, la relación entre el nivel de expresión de las dos subunidades se regula con el fin de maximizar la generación de producto. Se ha demostrado previamente que los niveles de proteína de subunidades heterodiméricas tienen efecto en la generación del producto final (Simmons LC, J Immunol Methods. 1 de mayo de 2002; 263(1-2): 133-47). Se puede lograr la regulación antes de la etapa de apareamiento mediante la selección para un marcador presente en el vector de expresión. Aumentando establemente el número de copias del vector, se puede aumentar el nivel de expresión. En algunos casos, puede ser deseable aumentar el nivel de una cadena con respecto a la otra, con el fin de alcanzar una proporción equilibrada entre las subunidades del polipéptido. Los marcadores de resistencia a antibióticos son útiles para este propósito, por ejemplo, el marcador de resistencia a Zeocina, resistencia a G418, etc, y proporcionan un medio de enriquecimiento para las cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa mediante la selección de los transformantes que son resistentes a mayores niveles de Zeocina o G418. La proporción adecuada, por ejemplo, 1:1; 1:2; etc. de los genes de las subunidades puede ser importante para la producción eficaz de proteína. Incluso cuando se utiliza el mismo promotor para transcribir ambas subunidades, muchos otros factores contribuyen al nivel final de proteína expresada y, por lo tanto, puede ser útil aumentar el número de copias de un gen codificado con respecto al otro. Alternativamente, se crean cepas diploides que producen niveles más elevados de un polipéptido, con respecto a las cepas de vectores con una sola copia, emparejando dos cepas haploides, ambas las cuales tienen múltiples copias de los vectores de expresión.

30 Las células anfitrionas se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente, se aparean para formar cepas diploides, y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Se conocen en la técnica varios medios mínimos adecuados para el crecimiento de levaduras. Se podrían añadir a cualquiera de estos medios según sea necesario un suplemento de sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, elementos traza, y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula anfitriona seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

35 Las proteínas secretadas se recuperan del medio de cultivo. Un inhibidor de proteasa, tal como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales. La composición puede ser concentrada, filtrada, sometida a diálisis, etc., usando métodos conocidos en la técnica.

Las células diploides de *Pichia* de la invención se cultivan con fines de producción. Tales propósitos de producción incluyen deseablemente el crecimiento en medio mínimo, cuyo medio carece de aminoácidos preformados y otras biomoléculas complejas, por ejemplo, medios que comprenden amoníaco como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de energía y carbono, y sales como fuente de fosfato, calcio y similares. Preferiblemente tales medios de producción carecen de agentes selectivos tales como antibióticos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc. Las células diploides se pueden cultivar a una densidad celular elevada, por ejemplo al menos aproximadamente 50 g/L; más usualmente al menos aproximadamente 100 g/L, y puede ser al menos aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500 g/L o más.

En una realización de la invención, el crecimiento de las células sujeto para los fines de producción se realiza a bajas temperaturas, cuyas temperaturas pueden disminuir durante la fase log, durante la fase estacionaria, o ambas. El término "baja temperatura" se refiere a temperaturas de al menos aproximadamente 15°C, más habitualmente al menos aproximadamente 17°C, y puede ser de aproximadamente 20°C, y generalmente no es más de aproximadamente 25°C, más habitualmente de no más de aproximadamente 22°C. La temperatura de crecimiento puede afectar a la producción de proteínas secretadas completas en cultivos de producción, y la disminución de la temperatura de crecimiento de cultivo puede tener una gran mejora sobre el rendimiento de producto intacto. La disminución de la temperatura parece ayudar al tráfico intracelular a través de las rutas de plegamiento y de procesamiento post-traduccional utilizadas por el anfitrión para generar el producto objetivo, junto con la reducción de la degradación por proteasas celulares.

Los métodos de la invención proporcionan la expresión de proteínas activas, secretadas, en particular, anticuerpos activos, secretadas, donde "anticuerpos activos", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un multímero correctamente plegado de al menos dos cadenas correctamente emparejadas, que se une con precisión a su antígeno cognado. Los niveles de expresión de proteína activa son usualmente al menos aproximadamente 50 mg/litro de cultivo, más habitualmente al menos aproximadamente 100 mg/litro, preferiblemente al menos aproximadamente 500 mg/litro, y puede ser de 1000 mg/litro o más.

Los métodos de la invención pueden proporcionar un aumento de la estabilidad del anfitrión de *Pichia* y las secuencias codificantes heterólogas durante la producción. La estabilidad se pone de manifiesto, por ejemplo, mediante el mantenimiento de altos niveles de expresión en el tiempo, donde el nivel inicial de expresión disminuye no más de aproximadamente 20%, generalmente no más de 10%, y puede disminuir no más de aproximadamente 5% a lo largo de aproximadamente 20 duplicaciones, 50 duplicaciones, 100 duplicaciones, o más.

La estabilidad de la cepa de *Pichia* también proporciona el mantenimiento de la integridad de secuencia génica heteróloga a lo largo del tiempo, donde se mantienen la secuencia de la secuencia codificante activa y los elementos reguladores de la transcripción necesarios en al menos aproximadamente el 99% de las células diploides, generalmente en al menos aproximadamente 99,9% de las células diploides, y preferiblemente en al menos aproximadamente 99,99% de las células diploides a lo largo de aproximadamente 20 duplicaciones, 50 duplicaciones, 100 duplicaciones, o más. Preferiblemente, esencialmente todas las células diploides mantienen la secuencia de la secuencia codificante activa y los elementos reguladores de la transcripción necesarios.

Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies animales o géneros, constructos y reactivos concretos descritos, ya que pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos, dispositivos y materiales similares cualesquiera o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen a continuación.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria tienen el propósito de describir y revelar, por ejemplo, las líneas celulares, constructos, y metodologías que se describen en las publicaciones, que se podrían utilizar en relación con la invención actualmente descrita. Las publicaciones descritas anteriormente y en todo el texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que los autores de la presente invención no tienen derecho a prefechar dicha descripción en virtud de la invención anterior.

Los ejemplos siguientes se presentan con el fin de proporcionar a los expertos normales en la técnica una exposición y descripción completas de cómo hacer y usar la invención sujeto, y no están destinados a limitar el alcance de lo que se considera como la invención y se define en las reivindicaciones. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc) pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados; y la presión es la atmosférica o próxima.

EXPERIMENTACIÓN

Ejemplo 1

Para demostrar la eficacia del método de producción de anticuerpos diploides se prepararon los siguientes reactivos.

Genes de anticuerpos: Se clonaron y construyeron los genes que dirigían la síntesis de tres formas de un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado quimérico OKT3. Las fuentes de las regiones variables para uso en estos constructos se pueden encontrar en GenBank. Número de acceso A22261; cadena pesada de OKT3 de ratón (Solicitud de Patente Internacional WO 9109967-A 3 11 de Julio de 1991). Número de acceso A22259; cadena ligera de OKT3 de ratón (Solicitud de Patente Internacional WO 9109967-A 3 11 de Julio de 1991).

Las tres formas utilizaron el gen de la cadena ligera $V_{\kappa}C_{\kappa}$ idéntico (SEQ ID NO: 10). Para los tres genes de la cadena pesada, todos codificaron de la región variable de ratón idéntica (V_{μ}) pero diferían entre sí en la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de las cadenas pesadas humanas. El primer constructo dirigió la síntesis de una cadena pesada de tipo salvaje completa ($C_{\mu 1}$) con su único sitio de glicosilación unido a N normal presente (cadena pesada glicosilada completa) (SEQ ID NO: 13 y 14). El segundo gen dirigió la síntesis de una cadena pesada no glicosilada creada mutando un nucleótido en la secuencia de modo que una treonina en posición 301 cambió a alanina en la secuencia de reconocimiento del sitio de glicosilación (ASN-X-Thr/Ser) (cadena pesada no glicosilada completa) (SEQ ID NO: 15). El tercer constructo génico dirigió la síntesis de una cadena pesada en la que se había suprimido la mayor parte de la región constante después de la región bisagra (cadena pesada Fab) (SEQ ID NO: 16).

Vector de expresión: El vector contiene los siguientes componentes funcionales: 1) un origen de replicación ColE1 mutante, que facilita la replicación del vector plasmídico en las células de la bacteria *Escherichia coli*; 2) un gen bacteriano *Sh ble*, que confiere resistencia al antibiótico Zeocina y sirve como marcador seleccionable para transformaciones tanto de *E. coli* como de *P. pastoris*; 3) un casete de expresión compuesto por el promotor del gen de la gliceraldehído deshidrogenasa (gen *GAP*), fusionado a secuencias que codifican la secuencia líder de secreción pre pro del factor de apareamiento alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, seguido de secuencias que codifican una señal de terminación de la transcripción de *P. pastoris* del gen de la alcohol oxidasa I (*AOX1*) de *P. pastoris*. El gen marcador de resistencia a Zeocina proporciona un medio de enriquecimiento para las cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa mediante la selección de los transformantes que son resistentes a mayores niveles de Zeocina.

Cepas de P. pastoris: Las cepas auxótrofas utilizadas en este ejemplo son las cepas *ade1* y *ura3* de *P. pastoris*, que requieren un suplemento de adenina y uracilo, respectivamente, para el crecimiento. También se han utilizado las cepas *met1* y *lys3*. Aunque se podían utilizar dos conjuntos complementarios cualesquiera de las cepas de *Pichia* auxótrofas para la construcción y el mantenimiento de cepas diploides, estas dos cepas son especialmente adecuadas para este método por dos razones. En primer lugar, crecen más lentamente que las cepas diploides que son el resultado de su apareamiento o fusión. Así, si un pequeño número de células haploides *ade1* o *ura3* permanecer presentes en un cultivo o surgen a través de meiosis u otro mecanismo, la cepa diploide debería superarlas en el cultivo.

En segundo lugar es que resulta fácil de supervisar el estado sexual de estas cepas ya que las colonias del producto diploide de su apareamiento son de un color blanco normal o crema, mientras que las células de cualquiera de las cepas que son mutantes *ade1* haploides en cultivo forman una colonia con un color rosa característico. Además, ninguna de las cepas que son mutantes *ura3* haploides son resistentes al fármaco ácido 5-fluoro-órótico (FOA) y pueden ser identificadas con sensibilidad mediante muestras en placa de un cultivo en sobre medio mínimo + placas de uracilo con FOA. En estas placas, solo pueden crecer y formar colonias las cepas mutantes *ura3* que requieren uracilo (presumiblemente haploides). De este modo, con las cepas parentales haploides marcadas con *ade1* y *ura3*, se puede verificar fácilmente el estado sexual de las cepas diploides productoras de anticuerpos resultantes (haploide frente a diploide).

Métodos

Construcción de vectores de expresión pGAPZ-alfa para la transcripción de genes de cadena ligera y pesada de anticuerpos. Para la clonación de las regiones variables de cadena tanto ligera como pesada, se cultivaron células de una línea celular hibridoma CD3 de OKT3 de ratón y se extrajo el ARN total. Se llevaron a cabo a continuación dos reacciones de RT-PCR, una específica para la secuencia codificante de la región variable de la cadena ligera y una específica para la secuencia codificante de la región variable de la cadena pesada de los genes del anticuerpo OKT3. Los cebadores empleados para amplificar la región variable de las cadenas pesada y ligera fueron (SEQ ID NO: 1) 5'-CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTC-3' y (SEQ ID NO: 3) 5'-CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCC-3' junto con el (SEQ ID NO: 2) 5'-TGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGC-3' y el (SEQ ID NO: 4) 5'-GACAGATGGTGCAGCCACAGCCCGG TTTATTTCCAACCTTTGTCC-3' para las regiones variables respectivas.

Para los genes de de la región constante de las cadenas pesada y ligera humanas, se adquirió una genoteca de ADNc de leucocitos humanos 5'-Stretch Plus de Clontech (HL 5019t). Se realizaron dos reacciones de PCR en esta

genoteca usando cebadores específicos para las regiones constantes de la cadena pesada y ligera, respectivamente (cadena pesada: (SEQ ID NO: 6) 5'-GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA-3' y (SEQ ID NO: 5) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAG -3' de longitud completa junto con (SEQ ID NO: 7) 5'-TGCGGCCGCTCATGGGCACGGTGGGCATGTGT-3' para la generación de FAB; cadena ligera: (SEQ ID NO: 9) 5'-GGACAAAGTTGAAATAAACCGGGCTGTGGCTGCACCATCTGTC-3' y (SEQ ID NO: 8) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT-3'.

Una secuencia de ADN que codificaba la región variable de la cadena ligera de ratón se fusionó en marco con una secuencia que codificaba la región constante de la cadena ligera humana (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12). Un fragmento que codificaba el constructo de fusión final se insertó en el vector de expresión pGAPZ-alfa de *P. pastoris* por medio de ligación de los sitios 5'-Xho1 y 3'-Not1 en pGAPZ-alfa. La secuencia de ADN que codificaba la región variable pesada de ratón se fusionó en el marco a secuencias que codificaban cada una de las tres regiones constantes de cadena pesada humana. Estos productos de fusión se insertaron a continuación utilizando una estrategia 5'-Xho1 y 3'-Not1 similar en pGAPZ-alfa. (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 para la versión glicosilada; SEQ ID NO: 15 para la versión aglicosilada; SEQ ID NO: 16 para el fragmento Fab). Las secuencias de ADN de los genes anticuerpos adecuados en todos los vectores se confirmaron mediante secuenciación directa del ADN antes de seguir trabajando.

Transformación de vectores de expresión en las cepas anfitrionas ade1, ura3, met1 y Lys3 haploides de P. pastoris. Todos los métodos utilizados para la transformación de las cepas de *P. pastoris* haploides y la manipulación genética del ciclo sexual de *P. pastoris* se realizaron como describen Higgins, D.R., y Cregg, J.M., Eds. 1998. *Pichia Protocols. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.

Antes de la transformación, cada vector de expresión fue linealizado dentro de las secuencias promotoras *GAP* con AvrII para dirigir la integración de los vectores en el locus del promotor *GAP* del genoma de *P. pastoris*. Las muestras de cada vector se transformaron después individualmente en cultivos electrocompetentes de las cepas *ade1, ura3, met1* y *lys3* mediante electroporación y los transformantes útiles se seleccionaron sobre placas de YPD zeocina por su resistencia a este antibiótico. Se seleccionaron las colonias resultantes, se sembraron las colonias individuales sobre placas de YPD zeocina y luego se examinaron para determinar la presencia del inserto del gen del anticuerpo mediante un análisis de PCR sobre el ADN genómico extraído de cada cepa para el inserto del gen de anticuerpo adecuado y/o mediante la capacidad de cada cepa para sintetizar una cadena de anticuerpo mediante un método de transferencia de colonias/inmunotransferencia (Wung et. al. *Biotechniques* 21 808-812 (1996)). Las cepas *ade1, met1* y *lys3* haploides y que expresaban uno de los tres constructos de la cadena pesada se recogieron para determinar las construcciones diploides junto con la cepa *ura3* haploide que expresaba el gen de la cadena ligera. El haploide que expresaba los genes de la cadena pesada se aparearon con el haploide de cadena para *ura3* para generar el diploide secretor de proteína.

Apareamiento de cepas haploides que sintetizan una única cadena anticuerpo y selección de derivados diploides que sintetizan anticuerpos tetraméricos funcionales. Para aparear cepas haploides de *P. pastoris*, cada cepa productora de la cadena pesada *ade1* (o *met1* o *lys3*) que se fuera a cruzar se sembró en una placa rica en YPD y la cepa productora de la cadena ligera *ura3* se sembró en una segunda placa con YPD (~10 estrías por placa). Después de una o dos días de incubación a 30°C, las células de una placa de que contenía las cepas de la cadena pesada y de una placa que contenía las cepas de cadena ligera de *ura3* se transfirieron a un paño de terciopelo estéril sobre un bloque para réplica de placas en un patrón de trama lineal de manera que cada cepa de cadena pesada contuviera un parche de células mezcladas con cada cepa de cadena ligera. Las células cultivadas en placas de réplica aplicadas en estrías cruzadas se transfirieron después a una placa de apareamiento y se incubaron a 25°C para estimular el inicio del apareamiento entre las cepas. Después de dos días, las células en las placas de apareamiento se transfirieron de nuevo a un terciopelo estéril sobre un bloque para réplica de placas y después se transfirieron a placas con medio mínimo. Estas placas se incubaron a 30°C durante tres días para permitir el crecimiento selectivo de las colonias de las cepas diploides protótrofas. Las colonias que surgieron se recogieron y se sembraron en una segunda placa con medio segundo para aislar una sola colonia y purificar cada cepa diploide. Las líneas celulares diploides resultantes se examinaron a continuación para determinar la producción de anticuerpos.

Las supuestas cepas diploides se sometieron a ensayo para demostrar que eran diploides y contenían ambos vectores de expresión para la producción de anticuerpos. Para determinar la diploidía, se extendieron muestras de una cepa sobre placas de apareamiento para estimularlas a pasar por meiosis y formar esporas. Se recogieron los productos de esporas haploides y se sometieron a ensayo para determinar su. Si un porcentaje importante de los productos de esporas resultantes eran auxótrofos simples o dobles los autores de la presente invención llegaron a la conclusión de que la cepa original debía haber sido diploide. Las cepas diploides se examinaron para determinar la presencia de ambos genes de anticuerpos mediante la extracción de ADN genómico de cada una y utilizando este ADN en reacciones de PCR específicas para cada gen.

Fusión de cepas haploides que sintetizan una única cadena de anticuerpo y selección de derivados diploides que sintetizan anticuerpos tetraméricos funcionales. Como alternativa al procedimiento de acoplamiento descrito anteriormente, se formaron esferoplastos de los cultivos individuales de anticuerpo de cadena sencilla que producen cepas haploides *ade1* y *ura3* y sus esferoplastos resultantes fusionados usando polietilenglicol/CaCl₂. Las cepas

haploides fusionadas se embebieron después en agar que contenía sorbitol 1 M y medio mínimo para permitir que las cepas diploides regeneraran su pared celular y crecieran en colonias visibles. Las colonias resultantes se seleccionaron del agar, se sembraron en una placa con medio mínimo, y las placas se incubaron durante dos días a 30°C para generar colonias a partir de células individuales de líneas de células diploides. Las supuestas líneas celulares diploides resultantes se examinaron a continuación para determinar la diploidía y la producción de anticuerpos como se ha descrito anteriormente.

Purificación y análisis de anticuerpos. Una cepa diploide para la producción de anticuerpo completo se obtuvo mediante el apareamiento de la cepa de cadena ligera *ura3* 2252 y la cepa de cadena pesada *lys3* 2254 utilizando los métodos descritos anteriormente. Los medios de cultivo de los cultivos en matraz agitado o fermentador de cepas de expresión de *P. pastoris* diploides se recogieron y examinaron para determinar la presencia de la proteína de anticuerpo mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando anticuerpos dirigidos contra las cadenas ligera y pesada de IgG humana, o específicamente contra la cadena pesada de IgG. Los datos se muestran en la Figura 2.

Para purificar los anticuerpos secretados por la levadura, se hicieron pasar los medios aclarados de los cultivos productores de anticuerpos a través de una columna de proteína A y tras el lavado con fosfato sódico 20 mM, pH 7,0, tampón de unión, se hizo eluir la proteína unida a proteína A utilizando tampón de glicina-HCl 0,1 M, pH 3,0. Las fracciones que contenían la mayor parte de la proteína total se examinaron mediante SDS-PAGE teñida con Azul de Coomassie e inmunotransferencia para determinar la proteína del anticuerpo. Las fracciones se examinaron también mediante un análisis ELISA en el que las placas de microtitulación se recubrieron primero con anti-IgG humana de cabra F(ab')₂, Fcy (Jackson Immuno, Núm. Cat. 109-006-008). A continuación las placas se hicieron reaccionar con las diluciones seleccionadas de los anticuerpos elaborados por la levadura. Finalmente, las placas se hicieron reaccionar con un fragmento de IgG F(ab')₂ anti-F(ab')₂ humano de cabra conjugado con HRP (Jackson Immuno, Núm. Cat 109-036-097). Las placas se revelaron después con sustrato TMP (Sigma Chemical) y las reacciones se sofocaron con HCl 0,5 M. Los resultados se cuantificaron en un lector de placas de microtitulación BioRad a 415 nm. Los datos se ilustran en la Figura 3.

Análisis para determinar la actividad de los anticuerpos. Se evaluó el anticuerpo quimérico derivado de levadura recombinante para determinar su actividad funcional a través de una tinción inmunohistoquímica de células que contenían el antígeno diana. El anticuerpo quimérico reconoce selectivamente el complejo CD3 encontrado en las células T. Se emplearon células T Jurkat como fuente de antígeno y se llevó a cabo la tinción de la superficie celular utilizando los procedimientos descritos en Andersson y Sander (Immunol Lett 31 de Enero 1989; 20(2): 115-20) o Andersson et. al. (Eur J Immunol 18 de Dic. de 1988; (12):2081-4).

Se inmovilizaron las células T Jurkat sobre portaobjetos de vidrio, se bloquearon con el suero de bloqueo apropiado y se tiñeron con anticuerpo primario recombinante generado por mamífero y levadura durante 1 hora. Las muestras inmovilizadas se trataron a continuación con el agente de bloqueo de peroxidasa seguido de tinción con un anticuerpo secundario selectivo de Fc biotinilado que es específico para cada forma del anticuerpo (anti-ratón para los mamíferos y anti-humano para la levadura). La detección se realizó utilizando un sistema de HRP-estreptavidina. La imagen digital se realizó para recopilar los datos para cada muestra teñida. La señal positiva se detecta en las muestras a través de una coloración oscura de las células observada en los paneles para OKT-3 derivado de mamífero y derivado de levadura. Estos datos se muestran en la Figura 4.

LISTA DE SEQUENCIAS.

<110> Cregg, James M.
Latham, John
Litton, Mark
Schatzman, Randall
Tolstorukov, Ilya

<120> Métodos para la síntesis de polipéptidos hetero-multiméricos en levaduras usando una estrategia de apareamiento haploide

<130> ALDR-001WO

<140> sin asignar
<141> 2004-10-22

<150> 60/513,876
<151> 2003-10-22

<160> 16

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 47

ES 2 393 555 T3

	<212> ADN <213> ratón	
	<400> 1 ccgctcgaga aaagagaggc tgaagctcag gtccagctgc agcagtc	47
5	<210> 2 <211> 41 <212> ADN <213> ratón	
10	<400> 2 tgggcccttg gtggaggctg aggagactgt gagagtggg c	41
	<210> 3 <211> 50 <212> ADN <213> ratón	
15	<400> 3 ccgctcgaga aaagagaggc tgaagctcaa attgttctca cccagtctcc	50
	<210> 4 <211> 44 <212> ADN <213> ratón	
20	<400> 4 gacagatggt gcagccacag cccggttat ttccaacttt gtcc	44
	<210> 5 <211> 38 <212> ADN <213> homo sapien	
25	<400> 5 ataagaatgc ggccgctcat ttaccggag acagggag	38
	<210> 6 <211> 41 <212> ADN <213> homo sapien	
30	<400> 6 gcaccactct cacagtctcc tcagcctcca ccaagggccc a	41
	<210> 7 <211> 32 <212> ADN <213> homo sapien	
35	<400> 7 tgcggccgct catgggcacg gtgggcatgt gt	32
	<210> 8 <211> 39 <212> ADN <213> homo sapien	
40	<400> 8 ataagaatgc ggccgctaac actctcccct gttgaagct	39
	<210> 9 <211> 44 <212> ADN <213> homo sapien	
45	<400> 9 ggacaaagt ggaaataaac cgggctgtgg ctgcaccatc tgtc	44

ES 2 393 555 T3

<210> 10
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> homo sapien

5 <400> 10

```

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 1          5          10          15
Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
          20          25          30
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
          35          40          45
Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp
65          70          75          80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe
          85          90          95
Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Val Ala Ala Pro Ser
          100          105          110
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
          115          120          125
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130          135          140
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145          150          155          160
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
          165          170          175

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
          180          185          190
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
          195          200          205
Arg Gly Glu Cys
210
    
```

<210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> ratón

10

<400> 11

```

caaatgtggtc tcaccagctc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaaat tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac 180
ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcggcat ggaggctgaa 240
gatgctgccca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg 300
acaaagttgg aaataaacgg g                                     321
    
```

<210> 12
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> homo sapien

15

<400> 12

```

gctgtggctg caccatctgt cttcatcttc cggccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
caciaagtct acgctgcca agtcacccat cagggcctga gctcgcctgt cacaaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgtta g                                     321
    
```

<210> 13
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> homo sapien

20

ES 2 393 555 T3

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 14

<211> 1350

<212> ADN

<213> homo sapien

5

ES 2 393 555 T3

<400> 14

```

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc 360
tcaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tggccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcy tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ctccatcccg ggatgagctg 1080

acCaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct cctgtctccc gggtaaatga . 1350

```

<210> 15

- 5 <211> 1350
- <212> ADN
- <213> homo sapien

<400> 15

```

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc 360
tcaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tggccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcy tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
gcctaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
acCaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct cctgtctccc gggtaaatga 1350

```

- 10 <210> 16
- <211> 699
- <212> ADN
- <213> homo sapien

<400> 16

ES 2 393 555 T3

```
caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatocta gccgtggtta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagcc 360
tccaccaagg gcccatoggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgect ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctcagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccatga 699
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis y recuperación de una proteína heteromultimérica heteróloga (no de levadura), biológicamente activa, secretada que comprende al menos dos cadenas de polipéptido de subunidades no idénticas, caracterizado por las siguientes etapas:

5 (i) producir una o varias células de levadura de *Pichia* diploides estables mediante apareamiento o fusión de esferoplastos de células de *Pichia* haploides en condiciones tales que dichos eventos de apareamiento o fusión de esferoplastos dan como resultado la producción de una o varias células de *Pichia* diploides, donde dichas una o varias células de *Pichia* diploides después de dicho apareamiento o fusión comprenden constructos de expresión que proporcionan la expresión y secreción de al menos dos cadenas de polipéptido no idénticas que constituyen dicha proteína heteromultimérica, y cuyas células de *Pichia* diploides estables son susceptibles de ensamblaje y expresión y secreción prolongada de dicha proteína heteromultimérica en un medio de cultivo que contiene dichas una o varias células de *Pichia* diploides estables cuando dichas una o varias células de *Pichia* diploides se cultivan en condiciones de cultivo apropiadas;

15 (ii) después de efectuar dicho apareamiento o fusión de esferoplastos, identificar y aislar las una o varias células de levadura de *Pichia* diploides resultantes que contienen constructos de expresión que proporcionan la expresión y secreción estables de al menos dos cadenas de polipéptido no idénticas que constituyen dicha proteína heteromultimérica cuando dichas una o varias células de *Pichia* diploides se cultivan en condiciones de cultivo apropiadas;

20 (iii) hacer crecer dichas una o varias células de *Pichia* diploides aisladas o su progenie diploide en un medio de cultivo en condiciones que dan como resultado la expresión, ensamblaje y secreción de dicha proteína heteromultimérica biológicamente activa en el medio de cultivo; y

(iv) recuperar la proteína heteromultimérica resultante del medio de cultivo.

25 2. El método de la reivindicación 1, donde dicho apareamiento o fusión de esferoplastos se lleva a cabo apareando o fusionando una primera célula haploide de levadura que contiene un primer constructo de expresión, conteniendo dicho primer constructo de expresión secuencias de ácido nucleico que codifican la expresión de al menos una subunidad de dicha proteína heteromultimérica, conectadas operablemente a un primer promotor de levadura, y una segunda célula haploide de levadura que contiene un segundo constructo de expresión, comprendiendo dicho segundo constructo de expresión secuencias de ácido nucleico que codifican las una o varias subunidades restantes de dicha proteína heteromultimérica, conectadas operablemente a un segundo promotor de levadura.

30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichas células de *Pichia* se seleccionan del grupo que consiste en *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, y *Pichia angusta*.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dichas células de *Pichia* son de *Pichia pastoris*.

5. El método de la reivindicación 1, donde la proteína heteromultimérica es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno.

35 6. El método de la reivindicación 1, donde dichos constructos genéticos están integrados en el genoma de dichas células de *Pichia* diploides.

7. El método de la reivindicación 1, donde dichos constructos genéticos están contenidos en un elemento extracromosómico (plásmido).

8. El método de la reivindicación 1, donde el primer o segundo promotores son constitutivos.

9. El método de la reivindicación 1, donde el primer o segundo promotores son inducibles.

40 10. El método de la reivindicación 1, donde las células de levadura diploides se hacen crecer en un medio de producción.

11. El método de la reivindicación 10, donde dicho medio de producción es un medio mínimo.

12. El método de la reivindicación 11, donde dicho medio mínimo carece de agentes selectivos.

45 13. El método de la reivindicación 11, donde dicho medio mínimo carece de aminoácidos preformados u otras biomoléculas complejas.

14. El método de la reivindicación 1, donde dichas células de *Pichia* diploides se hace crecer a una densidad celular elevada.

15. El método de la reivindicación 14, donde dicha densidad celular elevada es al menos 50 g/L.

16. El método de la reivindicación 15, donde dicha densidad celular elevada es al menos 100 g/L.

17. El método de la reivindicación 16, donde dicha densidad celular elevada es al menos 300 g/L.
18. El método de la reivindicación 17, donde dicha densidad celular elevada es al menos 400 g/L.
19. El método de la reivindicación 18, donde dicha densidad celular elevada es al menos 500 g/L.
- 5 20. El método de la reivindicación 1, donde dichas células de *Pichia* diploides se hacen crecer en condiciones que dan como resultado niveles de dicha proteína heteromultimérica biológicamente activa que son de al menos 50 mg/L.
21. El método de la reivindicación 20, donde dichas células de *Pichia* diploides se hacen crecer en condiciones que dan como resultado niveles de dicha proteína heteromultimérica biológicamente activa que son de al menos 100 mg/L.
- 10 22. El método de la reivindicación 21, donde dichas células de *Pichia* diploides se hacen crecer en condiciones que dan como resultado niveles de dicha proteína heteromultimérica biológicamente activa que son de al menos 500 mg/L.
- 15 23. El método de la reivindicación 22, donde dichas células de *Pichia* diploides se hacen crecer en condiciones que dan como resultado niveles de dicha proteína heteromultimérica biológicamente activa que son de al menos 1000 mg/L.
24. El método de la reivindicación 1, donde las células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 20 duplicaciones y mantienen niveles de expresión elevados de dicha proteína heteromultimérica después de dichas al menos 20 duplicaciones.
- 20 25. El método de la reivindicación 24, donde las células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 50 duplicaciones y mantienen niveles de expresión elevados de dicha proteína heteromultimérica después de dichas al menos 50 duplicaciones.
26. El método de la reivindicación 25, donde las células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 100 duplicaciones y mantienen niveles de expresión elevados de dicha proteína heteromultimérica después de dichas al menos 100 duplicaciones.
- 25 27. El método de la reivindicación 1, donde dichas células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 20 duplicaciones y después de dichas al menos 20 duplicaciones al menos 99% de dichas células diploides comprenden dichos constructos de expresión que proporcionan la expresión de dichas cadenas que constituyen dicha proteína heteromultimérica.
- 30 28. El método de la reivindicación 27, donde dichas células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 50 duplicaciones y después de dichas al menos 50 duplicaciones al menos 99% de dichas células diploides comprenden dichos constructos de expresión que proporcionan la expresión de dichas cadenas que constituyen dicha proteína heteromultimérica.
- 35 29. El método de la reivindicación 28, donde dichas células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 100 duplicaciones y después de dichas al menos 100 duplicaciones al menos 99% de dichas células diploides comprenden dichos constructos de expresión que proporcionan la expresión de dichas cadenas que constituyen dicha proteína heteromultimérica.
30. El método de la reivindicación 1, donde las células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 20 duplicaciones y después de dichas al menos 20 duplicaciones expresan la proteína heteromultimérica a un nivel de expresión que se reduce no más de 20% con respecto al nivel de expresión de partida.
- 40 31. El método de la reivindicación 30, donde las células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 50 duplicaciones y después de dichas al menos 50 duplicaciones expresan la proteína heteromultimérica a un nivel de expresión que se reduce no más de 20% con respecto al nivel de expresión de partida.
32. El método de la reivindicación 31, donde las células de *Pichia* diploides se cultivan durante al menos 100 duplicaciones y después de dichas al menos 100 duplicaciones expresan la proteína heteromultimérica a un nivel de expresión que se reduce no más de 20% con respecto al nivel de expresión de partida.
- 45 33. El método de la reivindicación 30, 31 o 32, donde las células de *Pichia* diploides expresan la proteína heteromultimérica a un nivel de expresión que se reduce no más de 10% con respecto al nivel de expresión de partida.
- 50 34. El método de la reivindicación 30, 31 o 32, donde las células de *Pichia* diploides expresan la proteína heteromultimérica a un nivel de expresión que se reduce no más de 5% con respecto al nivel de expresión de partida.

35. El método de la reivindicación 1, donde dicho cultivo que contiene dichas células de Pichia diploides se desarrolla a una temperatura que no es mayor de 22 grados C.

5 36. Un medio de cultivo que contiene un cultivo de Pichia diploide estable de acuerdo con la reivindicación 1, 3 o 4, donde el medio de cultivo comprende niveles de expresión de dicha proteína heteromultimérica biológicamente activa que son de al menos aproximadamente 50 mg/litro, 100 mg/litro, 500 mg/litro o 1000 mg/litro o más.

37. Un medio de cultivo que contiene un cultivo de Pichia diploide estable de acuerdo con la reivindicación 1, 3 o 4, que expresa dicha proteína heteromultimérica en un medio de cultivo en el que la densidad celular de células diploides de Pichia en dicho cultivo es al menos aproximadamente 50 g/litro, 100 g/litro, 300 g/litro, 400 g/litro, 500 g/litro o más.

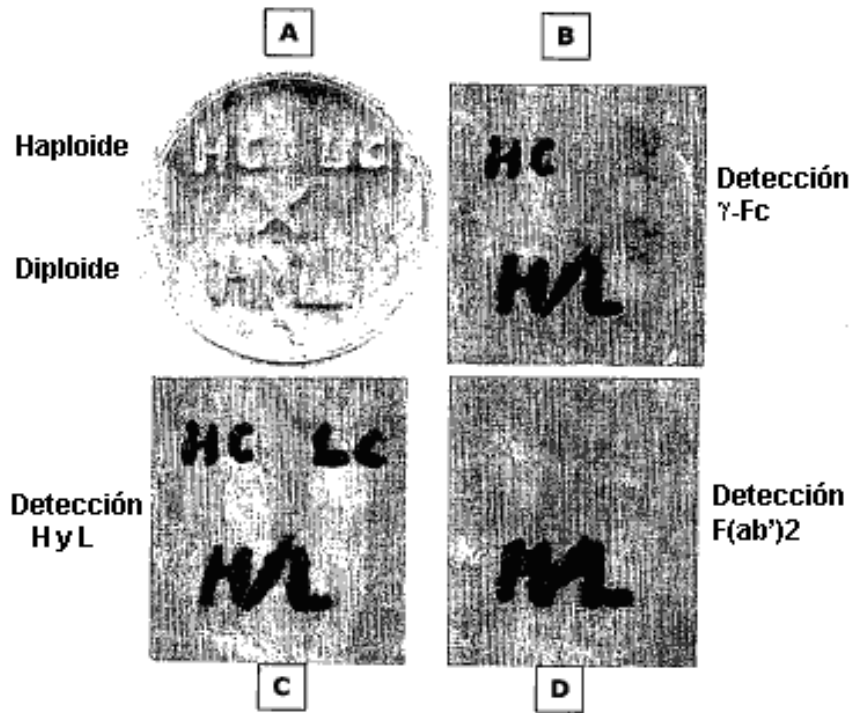


FIGURA 1

FIGURA 2

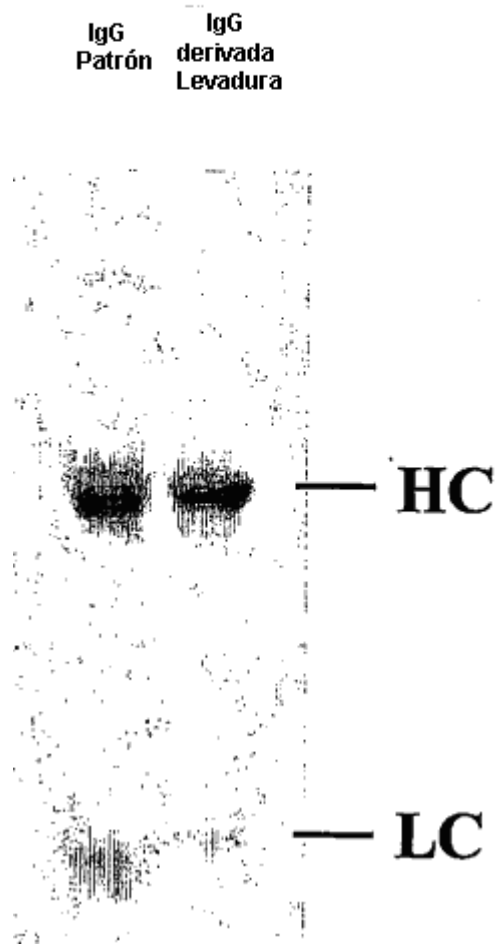
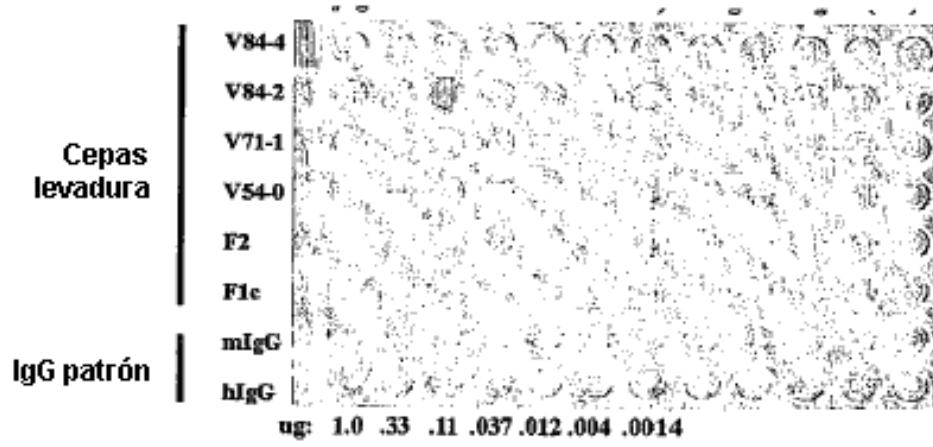


FIGURA 3



OKT3
derivado de mamífero

OKT3
derivado de levadura

Control
de fondo



FIGURA 4.