

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 551**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C40B 40/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2002 E 09007767 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2093286**

54 Título: **Vectores de presentación eucariotas multicatenarios y usos de los mismos**

30 Prioridad:

01.10.2001 US 326320

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

31.05.2013

73 Titular/es:

**DYAX CORPORATION (100.0%)
300 TECHNOLOGY SQUARE, 8TH FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**HUFTON, SIMON, E. y
HOOGENBOOM, HENDRICUS, R., J., M.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 405 551 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

Vectores de presentación eucariotas multicatenarios y usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 El desarrollo de la tecnología de presentación en fagos, mediante la cual se expresan y anclan polipéptidos o proteínas no nativas (heterólogas) sobre la superficie ("presentación") de un bacteriófago, es una herramienta potente para la identificación de moléculas que poseen actividades biológicas de interés, por ejemplo ligandos peptídicos que se unen con especificidad y/o afinidad alta a una molécula diana determinada. Es posible clonar en marco bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos en la secuencia codificante de genes que codifican una proteína de superficie de fago, por ejemplo el gen III o el gen VIII del fago M13. Estos clones, cuando se expresan, se
10 "presentan" sobre la superficie del fago en forma de una pluralidad, debido a la variación en la secuencia de los oligonucleótidos usados, de proteínas de fusión péptido-cápside. Estas bibliotecas de presentación de péptidos se exploran entonces para determinar la unión a moléculas diana, habitualmente por selección de afinidad o "bioselección" (Ladner, R. et al., 1993; Kay et al, 1996; Hoogenboom, H, et al, 1997).

15 La identificación de bibliotecas de presentación de fagos presenta numerosas ventajas con respecto a otros métodos de identificación debido al elevado número de diferentes polipéptidos (típicamente, de más de 1×10^9) que pueden estar contenidos en una única biblioteca de presentación de fagos. Esto permite la identificación de una biblioteca altamente diversa en una sola etapa de identificación. La presentación en fagos de pequeños péptidos o proteínas monocatenarias es ventajosa mientras no se requiera o desee un procesamiento intracelular o una modificación post-traducciona (de lo que no son capaces los fagos o los huéspedes procariotas). Por ejemplo, la presentación
20 eficaz de un polipéptido heterólogo puede requerir diversas modificaciones post-traduccionales, estructuras intracelulares y una serie de enzimas especializadas y proteínas chaperonas que son necesarias para transportar, glicosilar, adaptar, reunir y anclar adecuadamente el polipéptido de presentación sobre la superficie de la célula hospedadora; sin embargo, ninguno de estos procesos se puede conseguir mediante procesos de bacteriófagos o células procariotas.

25 Para la presentación de proteínas eucariotas más complejas, por ejemplo polipéptidos multicatenarios que incluyen inmunoglobulinas y fragmentos funcionales de las mismas (por ejemplo, Fab), o de los dominios extracelulares de moléculas de MHC o moléculas receptoras de células T, es preciso superar problemas adicionales: la expresión coordinada de las cadenas componentes a los niveles de expresión suficientes para producir productos multicatenarios, el transporte y secreción de cada cadena, logrando al mismo tiempo la asociación en un polipéptido
30 multicatenario funcional, y la inmovilización (anclaje) de al menos una cadena del polipéptido multicatenario en la superficie de la célula hospedadora (es decir, para su presentación), a la vez que se retiene la unión y funcionalidad apropiada fuera de la célula hospedadora del producto polipeptídico multicatenario.

35 Se han dado a conocer sistemas de presentación que utilizan células eucariotas, tales como levaduras, para expresar y presentar polipéptidos monocatenarios (Boder, E. y Wittrup, K., 1998; Horwitz, A. et al., 1988; Kieke M. et al., 1997; Kieke, M. et al., 1999; documentos WO 94/18330; WO 99/36569); sin embargo, existe la necesidad de sistemas eucariotas optimizados para la expresión y presentación funcional de polipéptidos multicatenarios, particularmente inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas. Además, existe en la técnica la necesidad de presentar polipéptidos en un sistema que utilice el poder de la presentación en fagos y las ventajas de procesamiento de las células hospedadoras eucariotas. Por ejemplo, en contraste con las bibliotecas de
40 presentación en fagos, el tamaño práctico máximo, o "diversidad", de una biblioteca que se puede expresar en y presentar sobre la superficie de una célula hospedadora eucariota es alrededor de 10^6 a 10^7 .

45 Estos y otros problemas técnicos han obstaculizado el avance de las herramientas y técnicas biológicas útiles para identificar nuevas moléculas que poseen actividades biológicas interesantes. A causa de estos problemas técnicos, hasta la fecha no se han dado a conocer materiales ni métodos para la construcción satisfactoria de un vector de presentación eucariota multicatenario, de la presentación satisfactoria de un polipéptido multicatenario (tal como un anticuerpo o un fragmento Fab) sobre la superficie de una célula hospedadora eucariota (tal como una levadura), de la creación de una biblioteca de presentación de polipéptidos multicatenarios en células hospedadoras eucariotas, ni del uso eficaz de estas bibliotecas para detectar y aislar polipéptidos multicatenarios específicos de interés (por ejemplo, sobre la base de especificidad o afinidad de unión por una molécula diana).

50 SUMARIO DE LA INVENCION

55 Estas y otras deficiencias de la técnica se resuelven mediante vectores de presentación mejorados, células que contienen bibliotecas de presentación, y métodos para el uso de estas bibliotecas y vectores descritos aquí. De forma específica, la presente descripción proporciona un vector de presentación eucariota capaz de presentar un polipéptido multicatenario en la superficie de una célula hospedadora, de manera que la actividad biológica del polipéptido multicatenario se muestra en la superficie de la célula hospedadora. Un vector de este tipo permite la presentación de polipéptidos biológicamente activos más complejos, por ejemplo polipéptidos multicatenarios biológicamente activos, que la que se puede obtener a través de la tecnología de presentación en fagos convencional.

La presente descripción se refiere a la presentación y aislamiento de polipéptidos biológicamente activos. Específicamente, la presente invención se refiere al diseño y uso de nuevos vectores de presentación multicatenarios.

5 La presente invención describe y hace posible la presentación satisfactoria de un polipéptido multicatenario en la superficie de una célula hospedadora eucariota. Se describen vectores preferidos para expresar las cadenas de un polipéptido multicatenario en una célula hospedadora por separado e independientemente (por ejemplo, bajo elementos distintos de control de vectores y/o en vectores de presentación distintos, formando de este modo un conjunto de vectores correspondiente). El uso de estos conjuntos de vectores correspondientes proporciona un nivel de flexibilidad y versatilidad en la generación de bibliotecas de presentación, por ejemplo la capacidad para generar y presentar polipéptidos multicatenario combinando y recombinando vectores que expresan una diversidad de las cadenas individuales de un polipéptido multicatenario. Es posible diseñar repertorios completos de nuevas combinaciones de cadenas con el uso de estos conjuntos de vectores.

10 Adicionalmente, la invención proporciona la capacidad de combinar la tecnología de presentación en fagos (con su facilidad de manipulación y su magnitud de diversidad) con la complejidad y versatilidad potenciales de un vector (o conjunto de vectores) de presentación eucariota multicatenario. Los métodos particulares descritos en este documento permiten a un facultativo transferir eficazmente información sobre secuencias de una biblioteca de péptidos (o miembros seleccionados de la biblioteca) entre sistemas de presentación en fagos y de presentación en eucariotas, lo que se logra a través de la transferencia física de la información de secuencia desde un vector de presentación a otro (usando técnicas de ingeniería genética convencionales), o a través del uso de un nuevo vector de presentación dual, que se puede utilizar en sistemas tanto de presentación eucariota como de presentación en fagos (que necesariamente implica la expresión procariota).

15 La presente descripción se refiere a un vector nuevo, de utilidad en una célula hospedadora eucariota para presentar un polipéptido multicatenario en la superficie de la célula eucariota, de manera que en la superficie de la célula hospedadora se muestra una actividad biológica del polipéptido multicatenario, por ejemplo la actividad de unión de un polipéptido multicatenario. Aunque una realización preferida del vector es la de un único paquete genético replicable, el vector de presentación eucariota multicatenario puede existir como un vector único o como múltiples vectores independientes de un conjunto de vectores. Tal como se usa en este documento, "vector" se refiere a una única molécula de vector o a un conjunto de vectores. En una realización, el vector de presentación es un vector lanzadera, o más exactamente un vector de presentación dual, en el que el vector es capaz de presentar un polipéptido multicatenario biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota transformada con ese vector, o en la superficie de un bacteriófago generado como consecuencia de la expresión procariota. En otro aspecto de la invención, el vector puede existir como un conjunto de vectores, en el que cada cadena de un polipéptido multicatenario está codificada en uno de un par correspondiente de los vectores, de modo que cuando el par de vectores está presente en una única célula eucariota, las cadenas del polipéptido multicatenario se asocian y la actividad biológica del polipéptido multicatenario se muestra en la superficie de la célula eucariota.

20 El vector de presentación multicatenario eucariota comprende polinucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas del polipéptido multicatenario. Un primer polinucleótido codifica una primera cadena del polipéptido multicatenario unido a una proteína de anclaje. Otros polinucleótidos del vector (o conjunto de vectores) codifican otras cadenas del polipéptido multicatenario. Todos los polinucleótidos del o de los vectores de presentación se encuentran situados operativamente en el vector de presentación, de manera que una célula eucariota hospedadora, transformada con el vector (o conjunto de vectores), presenta el polipéptido multicatenario en la superficie de la célula eucariota, de manera que la actividad biológica del polipéptido multicatenario es mostrada en la superficie de la célula.

25 Preferiblemente, el polipéptido multicatenario codificado por el vector o vectores de presentación multicatenarios existe en forma de un polipéptido bi, tri, tetra o multicatenario. Más preferiblemente, el polipéptido multicatenario es un polipéptido bicatenario o tetracatenario compuesto por dos cadenas diferentes. Más preferiblemente, el polipéptido multicatenario se selecciona de un grupo de polipéptidos multicatenarios que consisten en receptores de células T, moléculas del MHC de clase I, moléculas del MHC de clase II y fragmentos Fab de inmunoglobulinas. Más preferiblemente, el polipéptido multicatenario es una IgA, IgD, IgE, IgG, IgM o un fragmento biológicamente activo de las mismas. Lo más preferible, el polipéptido multicatenario es un fragmento Fab, en el que el primer polinucleótido del vector de presentación multicatenario comprende un segmento que codifica los dominios V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig, y un segundo polinucleótido comprende un segmento que codifica una cadena ligera de Ig (dominios V_L y C_L).

30 De acuerdo con la presente invención, un primer polinucleótido que codifica una primera cadena del polipéptido multicatenario está unido a una proteína de anclaje. Preferiblemente, la proteína de anclaje es una proteína de la superficie celular de una célula eucariota o un fragmento funcional de la misma. Más preferiblemente, la proteína de anclaje es α -aglutinina, Aga1p, Aga2p o FLO1. Tal como se describe en este documento, la unión del polipéptido de la primera cadena a una proteína de anclaje se puede conseguir por medio de una diversidad de técnicas de biología molecular. Preferiblemente, el primer polinucleótido que codifica una primera cadena del polipéptido multicatenario se expresa en una célula hospedadora eucariota como una proteína de fusión de primera cadena-anclaje; más preferiblemente, una proteína de fusión de primera cadena:Aga2p.

En una realización, una o más de las cadenas del polipéptido multicatenario expresadas por el vector o vectores en una célula hospedadora están unidas a un gen informador o marcador. Preferiblemente, el marcador es un marcador de epítipo seleccionado del grupo que consiste en marcador 6xHis, marcador HA y marcador myc. Lo más preferible, cada cadena del polipéptido multicatenario está unida a un marcador diferente.

5 Preferiblemente, el vector o vectores de presentación multicatenarios proporcionan sitios de clonación para facilitar la transferencia de la secuencia o secuencias de polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multicatenario. Estos sitios de clonación comprenden un sitio de reconocimiento de una endonucleasa de restricción (es decir, sitios de restricción) situados para facilitar la escisión e inserción de polinucleótidos que codifican una o más cadenas de un polipéptido multicatenario. Por ejemplo, los sitios de restricción están localizados,
10 preferiblemente, en los extremos 5' y 3' del polinucleótido o de los polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multicatenario. El vector multicatenario puede contener solamente dos sitios de restricción posicionados en los extremos del segmento polinucleotídico que incluye todos los segmentos que codifican las cadenas del polipéptido multicatenario, o, preferiblemente, los sitios de restricción se presentan en los extremos de cada segmento polinucleotídico que codifica una cadena del polipéptido multicatenario (Figs. 1 y 2). Preferiblemente, cada
15 sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción es un sitio de reconocimiento único en el vector.

El vector (o conjunto de vectores) puede ser operable en una diversidad de células hospedadoras eucariotas, y opcionalmente puede ser operable también en células procariotas (por ejemplo, bacterias). Preferiblemente, el vector de presentación multicatenario de la presente invención es un vector de presentación en células animales, un vector de presentación en células vegetales, un vector de presentación en células fúngicas o un vector de presentación en una célula protista. Más preferiblemente, el vector de presentación es un vector de presentación en levadura. Lo más preferible, el vector de presentación en levadura es operable en *Saccharomyces cerevisiae*.
20

En otra realización, la invención se refiere a un método para usar el vector (o conjunto de vectores) descrito y mostrado en este documento para presentar un polipéptido multicatenario en la superficie de una célula hospedadora eucariota, en el que el vector (o conjunto de vectores) se introduce en la célula eucariota y la célula hospedadora se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión, transporte y asociación de las cadenas del polipéptido multicatenario, de modo que la actividad biológica del polipéptido multicatenario se muestra en la superficie de la célula hospedadora. Como se describe en este documento, los polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multicatenario se pueden introducir en la célula hospedadora a través de uno o múltiples vectores. La forma de introducir el vector o los vectores en la célula hospedadora incluye cualquiera de los métodos destinados a la introducción de material genético en una célula conocidos en la técnica. Las formas preferidas incluyen dichas técnicas de transformación conocidas en la técnica que incluyen, pero sin limitación, electroporación, microinyección, transferencia viral, inserción balística y similares.
25
30

Otra forma preferida de introducir vectores de presentación eucariotas multicatenarios en una célula hospedadora incluye la fusión de dos células eucariotas haploides, expresando cada una de ellas al menos una de las cadenas del polipéptido multicatenario, para producir una célula hospedadora diploide que expresa ambas (todas) cadenas, de manera que en la superficie de la célula hospedadora diploide resultante se muestra la actividad biológica del polipéptido multicatenario. Por ejemplo, cada una de las dos células haploides puede contener uno (o más) de los vectores de un conjunto de vectores (tal como se describe en este documento), de forma que la actividad biológica del polipéptido multicatenario se muestra en la superficie de la célula hospedadora diploide que se produce a partir de la fusión haploide/haploide. Preferiblemente, el par de células hospedadoras haploides son de tipos de apareamiento opuesto, facilitando de este modo la fusión ("apareamiento") de las dos células haploides eucariotas.
35
40

Se describe además una célula hospedadora eucariota que muestra en la superficie celular la actividad biológica de un polipéptido multicatenario. Como se describe en este documento, la célula hospedadora eucariota es preferiblemente una célula animal, una célula vegetal, una célula fúngica o una célula protista. Más preferiblemente, la célula hospedadora eucariota es una célula de levadura. Preferiblemente, la célula hospedadora de levadura se selecciona de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*. Lo más preferible, la célula hospedadora eucariota es *S. cerevisiae*. Las células hospedadoras eucariotas pueden ser de cualquier construcción genética, pero preferiblemente son haploides o diploides.
45

También se describe un par de células haploides eucariotas (preferiblemente, de tipos de apareamiento opuestos), en el que la primera célula haploide expresa al menos un primer polinucleótido que codifica una primera cadena de un polipéptido multicatenario biológicamente activo unido a una proteína de anclaje, y la segunda célula haploide expresa al menos un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multicatenario. Como se ha analizado anteriormente, la fusión de este par de células haploides da como resultado una célula diploide que muestra la actividad biológica del polipéptido multicatenario en la superficie celular.
50

Además, se describen en este documento colecciones de las diversas realizaciones, que forman bibliotecas nuevas de polipéptidos multicatenarios o de los polinucleótidos que los codifican. Las bibliotecas comprenden una pluralidad de vectores que codifican un polipéptido multicatenario, de manera que el vector es operable en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de las cadenas del polipéptido multicatenario, la asociación de las cadenas de forma que se constituya la actividad biológica del polipéptido multicatenario, y el anclaje de al menos una cadena del polipéptido multicatenario, de manera que la actividad biológica del polipéptido
55
60

multicatenario se muestre en la superficie de la célula hospedadora eucariota. Preferiblemente, la biblioteca de la presente invención está comprendida de miembros de la biblioteca que codifican una multiplicidad de diferentes polipéptidos multicatenarios. Lo más preferible, la biblioteca está formada por miembros de la biblioteca que codifican una multiplicidad de polipéptidos multicatenarios variantes (diseñados y producidos por la variegación de un molde de polipéptidos multicatenarios). Las nuevas colecciones de bibliotecas multicatenarias incluyen bibliotecas de vectores, bibliotecas de conjuntos de vectores, bibliotecas de células hospedadoras y bibliotecas de pares de células hospedadoras, como se describe y muestra en este documento.

También se describe un método para transferir información de secuencias de ácido nucleico que codifica un polipéptido multicatenario biológicamente activo entre un vector de presentación en fago y un vector de presentación eucariota. Un método de transferencia comprende insertar secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas de un polipéptido multicatenario obtenidas a partir de un vector de presentación en fago en un vector de presentación multicatenario eucariota, tal como se describe y muestra en este documento. La transferencia de la información de secuencia de ácido nucleico que codifica las cadenas de un polipéptido multicatenario puede producirse como un acontecimiento de transferencia aislado, o puede tener lugar como acontecimientos de transferencia distintos e independientes de la información de secuencia de ácido nucleico que codifica cada una de las cadenas del polipéptido multicatenario. De manera similar, la información de secuencia que codifica cada una de las cadenas de un polipéptido multicatenario se puede transferir a partir de un vector de presentación en fago o a partir de múltiples vectores de presentación diferentes.

Otro método para transferir la información de secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido multicatenario biológicamente activo entre un vector de presentación en fago y un vector de presentación eucariota (e inverso al que se acaba de describir) comprende la inserción de secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas de un polipéptido multicatenario, obtenidas de un vector de presentación multicatenario eucariota, tal como se ha descrito y mostrado en este documento, en un vector de presentación en fago. El proceso de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota es bidireccional, es *decir*, puede producirse desde el vector de presentación en fago al vector de presentación eucariota o desde el vector de presentación eucariota al vector de presentación en fago.

La transferencia de información de secuencia de ácido nucleico entre un vector de presentación en fago y el vector eucariota se puede lograr por medio de una diversidad de métodos de transferencia genética conocidos en la técnica (por ejemplo, tecnología de ingeniería genética tal como tecnología de ADN recombinante). Las formas preferidas de transferencia incluyen técnicas de digestión de restricción, amplificación por PCR o recombinación homóloga (por ejemplo, véase Liu, Q. et al., 2000; Walhout, A. et al., 2000).

La presente invención se dirige también a métodos para detectar y aislar polipéptidos multicatenarios que muestran una actividad biológica de interés para el facultativo, como se define en las reivindicaciones. Los métodos de la presente invención permiten la detección de interacciones deseables entre polipéptidos multicatenarios y otras especies moleculares, preferiblemente, interacciones proteína-proteína, y más preferiblemente interacciones entre polipéptidos multicatenarios y sus ligandos/sustratos (es *decir*, moléculas diana). Preferiblemente, la naturaleza de esta interacción comprende una asociación (es *decir*, unión) no covalente entre las especies moleculares, si bien la naturaleza de la unión puede ser transitoria (por ejemplo, unión enzima-sustrato) o de alta afinidad/avidez (por ejemplo, como ocurre con ligandos de afinidad útiles en separaciones, diagnósticos y/o tratamientos).

En una realización, el método de la presente invención es útil para explorar una biblioteca de polipéptidos multicatenarios (expresados en la superficie de una célula hospedadora eucariota) mediante la detección de los miembros de la biblioteca que muestran una actividad biológica de interés para el facultativo. En una realización particularmente preferida, se aíslan células hospedadoras que presentan polipéptidos multicatenarios que muestran la actividad biológica de interés. A continuación, las células hospedadoras aisladas se pueden someter opcionalmente a rondas repetidas de identificación, o de otra forma se pueden manipular para caracterizar o utilizar la secuencia polipeptídica del polipéptido multicatenario presentado. Además, el método de identificación de la presente invención se puede combinar con una identificación (preliminar) de presentación en fago y transferencia de los aislados seccionados de presentación en fago al sistema de presentación eucariota descrito en este documento para la identificación de presentación eucariota.

En una realización adicional de la presente invención, es posible explorar una biblioteca de polipéptidos multicatenarios presentados en la superficie de una célula hospedadora diploide eucariota, en la que la célula diploide contiene un conjunto de vectores multicatenarios como se ha descrito y mostrado en este documento, para detectar (y opcionalmente aislar) polipéptidos multicatenarios que muestran una actividad biológica de interés para el facultativo, como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la célula hospedadora diploide eucariota es el producto de la fusión de un par de células hospedadoras haploides eucariotas, como se ha descrito y mostrado en este documento. En una realización particularmente preferida, se pueden aislar células diploides detectadas que presentan un polipéptido multicatenario que muestra una actividad biológica de interés y, a continuación, opcionalmente, pueden sufrir meiosis, mediante la cual las células hijas (haploides) expresan cadenas distintas del polipéptido multicatenario seleccionado. Después, las células hijas se pueden fusionar opcionalmente con otras células haploides que expresen cadenas de un polipéptido multicatenario (por ejemplo, otras células hijas de la misma sub-población de células diploides aisladas), dando lugar a una población de recombinación de células hospedadoras diploides eucariotas que presentan en su superficie un polipéptido multicatenario. Se pueden llevar a

cabo rondas adicionales de identificación y recombinación repetida de las cadenas individuales del polipéptido multicatenario seleccionado, y, en última instancia, la secuencia polipeptídica del polipéptido multicatenario presentado se puede caracterizar o utilizar como se ha descrito anteriormente. La recombinación de las células hijas haploides seleccionadas también se puede recombinar (por fusión celular) con otros vectores de presentación eucariotas, modificados o no, para producir nuevas bibliotecas de células hospedadoras de presentación multicatenarias.

El vector de presentación eucariota se puede utilizar para crear una biblioteca de presentación eucariota, tal como una biblioteca de presentación en levadura, que comprende una pluralidad de tales vectores de presentación eucariotas. Preferiblemente, una pluralidad de vectores de presentación eucariotas codificará una población heterogénea de polipéptidos multicatenarios, dando lugar a un repertorio presentado de polipéptidos multicatenarios, *por ejemplo*, al menos 10^4 , preferiblemente al menos 10^5 , más preferiblemente al menos 10^6 , más preferiblemente al menos 10^7 , más preferiblemente al menos 10^8 y, lo más preferible, al menos 10^9 polipéptidos diferentes.

En realizaciones particulares de la invención, el anclaje es un polipéptido operable como anclaje en la superficie de una célula eucariota y operable como anclaje en la superficie de un fago. En otras realizaciones, el anclaje es una porción de una proteína de superficie que se ancla a la superficie celular de una célula hospedadora eucariota y a la superficie de un fago.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el anclaje y una cadena del polipéptido multicatenario se expresan como una proteína de fusión. En otras realizaciones, el anclaje y una cadena del polipéptido multicatenario se unen en la expresión a través de un enlace indirecto tal como, preferiblemente, un enlace Jun/Fos.

En otra realización, la invención se refiere a un método para presentar, en la superficie de una célula hospedadora eucariota, un polipéptido multicatenario biológicamente activo que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, como se define en las reivindicaciones, que comprende las etapas de introducir en una célula hospedadora eucariota un primer vector eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica una primera cadena polipeptídica de un polipéptido multicatenario biológicamente activo ligado a un anclaje de la superficie celular, en el que dicho vector es operable en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de dicha primera cadena; y un segundo vector eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena polipeptídica de dicho polipéptido multicatenario, en el que dicho vector es operable en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de dicha segunda cadena, en el que una célula hospedadora eucariota transformada con dicho primer vector eucariota y dicho segundo vector eucariota muestra, en la expresión de los citados primer y segundo polinucleótidos, la actividad biológica de dicho polipéptido multicatenario en la superficie de la célula hospedadora eucariota; y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones apropiadas para la expresión de dichos primer y segundo polinucleótidos.

En una realización adicional, la invención se refiere a un método para presentar, en la superficie de una célula hospedadora eucariota, un polipéptido multicatenario biológicamente activo que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, como se define en las reivindicaciones, que incluye las etapas de introducir en una célula hospedadora eucariota un vector de presentación eucariota, un conjunto de vectores de presentación eucariotas o un vector de presentación dual, como se ha descrito anteriormente, y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión de dichos polinucleótidos.

También se describe una célula hospedadora eucariota que comprende un vector de presentación eucariota, un conjunto de vectores de presentación eucariotas o un vector de presentación dual, como se descrito en este documento. Las células hospedadoras eucariotas adecuadas pueden ser células animales, células vegetales o células fúngicas. Preferiblemente, la célula hospedadora eucariota será una célula de mamífero, una célula de insecto y una célula de levadura. Lo más preferiblemente, la célula hospedadora eucariota será una célula de levadura, *por ejemplo*, seleccionada del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Debaromyces* o *Candida*. Los hospedadores de levadura preferidos incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. La célula hospedadora de levadura más preferida es *Saccharomyces cerevisiae*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos, en los que caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes en las diferentes vistas. Los dibujos no necesariamente están realizados a escala, sino que, por el contrario, se hace énfasis en ilustrar los principios de la invención.

La Fig.1 es un diagrama esquemático que ilustra el sistema de transferencia presentación en fago-presentación eucariota. La información genética que codifica las cadenas de un polipéptido Fab se transfiere desde un vector de presentación en fago a un vector eucariota multicatenario en forma de un único ácido nucleico escindido. Después se sustituyen (si los hay) los elementos genéticos no deseados que intervienen.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático que ilustra el sistema de transferencia presentación en fago/presentación eucariota, en el que la información genética que codifica las cadenas de un polipéptido Fab se transfiere de forma independiente y separada desde un vector de presentación en fago hasta un vector de presentación eucariota multicatenario.

5 La Fig. 3 es un diagrama esquemático del vector de presentación en levadura multicatenario, pTQ3, que presenta sitios únicos de clonación para la inserción de al menos dos cadenas de un polipéptido multicatenario (*por ejemplo*, componentes de la cadena ligera y pesada de Fab), con elementos adicionales dispuestos de tal forma que las dos cadenas se expresan de modo independiente mediante la inducción de los promotores GAL1 en tándem. En este vector, una primera cadena (*por ejemplo*, una cadena ligera de Ig), insertada como un fragmento *ApaI/Ascl*, se expresa como una proteína secretora soluble usando la secuencia señal Aga2p (Aga2p/ss) y se fusiona con un marcador de epítipo HA. Una segunda cadena (*por ejemplo*, un fragmento de cadena pesada de Ig), insertada como un fragmento *Sfil/NotI*, se expresa como una proteína de fusión unida a la superficie celular usando la Aga2p/ss y anclando la subunidad de la proteína (Aga2p madura). La segunda cadena se fusiona de manera similar con un marcador de epítipo myc. También se indican otros elementos de utilidad para la replicación de plásmidos (*por ejemplo*, pMB1-ori y Cen6/ARSH4) y útiles como marcadores selectivos (es decir, *ampR* y *TRP*).

20 Las Figs. 4A-4C son representaciones de datos que demuestran la expresión independiente de proteínas de fusión. La Fig. 4A muestra la expresión de la proteína de fusión de 45 kD Aga2p-V_H-C_H1 en células hospedadoras de levadura EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pTQ3-PH1, y la Fig. 4B muestra la expresión de la cadena VL-CL de 30 kD en células hospedadoras de levadura EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pTQ3-PH1. No se detectaron productos de fusión en ninguno de los controles de vectores vacíos. Para cada célula hospedadora, se prepararon muestras tanto antes (-) como después (+) de la inducción con galactosa de los promotores GAL1 operables en los vectores de presentación en levadura. La Fig. 4C es una representación de la detección mediante inmunofluorescencia de anticuerpos Fab ensambados en la superficie de la célula de levadura, (a) contraste de fase, (b) detección de HC, (c) detección de LC.

25 Las Figs. 5A-C representan una serie de gráficas de citometría. La Fig. 5A muestra células de levadura transformadas con pTQ3-F2 (panel izquierdo) y pTQ3-PH1 (panel derecho); las construcciones se dejaron sin tratar (línea de puntos) o se indujeron durante 48 horas a 20°C (línea de color gris claro). La presentación de cadena pesada (a), cadena ligera (b) y la unión a antígeno (c) se analizaron usando citometría de flujo.

30 La Fig. 6 es una gráfica de histograma que ilustra el ELISA de células enteras de tres Fab anti-estreptavidina diferentes presentados en la superficie de células hospedadoras de levadura EBY100 pTQ3-F2, EBY100 pTQ3-A12 y EBY100 pTQ3-4C8. Se indican, respectivamente, la unión a antígeno, la presentación de LC y la presentación de HC.

35 La Fig. 7 es una gráfica de citometría de una mezcla de células de levadura. EBY100 pTQ3-F2, EBY100 pTQ3-A12 y EBY100 pTQ3-A12/pESC se marcaron doblemente tanto para la unión a antígeno como para la presentación de LC. Se indica una gráfica de la presentación de LC frente a la unión a antígeno y un "acotamiento" de la unión a antígeno normalizada.

40 Las Figs. 8A-8D son representaciones de datos que muestran la unión a repertorios de levaduras y clones de levadura seleccionados individualmente a diferentes concentraciones de antígeno. La Fig. 8A muestra una serie de histogramas de unión a antígeno y presentación de Fab para la biblioteca no seleccionada (a) y los rendimientos policlonales de los rondas de selección 1, 2 y 3 (b, c, d). El repertorio de levaduras anti-estreptavidina diversificado se sometió a tres rondas de FACS. Se indica el acotamiento de clasificación usado en cada selección de biblioteca. La Fig. 8B muestra el análisis por FACS policlonal a diferentes concentraciones de antígeno de una campaña de selección por afinidad FACS de un repertorio anti-estreptavidina. Una serie de gráficas de citometría bivalentes marcadas tanto para la unión a antígeno como para la presentación de Fab muestra un incremento en la población de células de levadura, mostrando una mayor relación de unión a antígeno frente a presentación de Fab. La Fig. 8C muestra datos obtenidos a partir de células de levadura que presentan el F2 natural (representado por "o") y los mutantes R2E10 (representados por triángulos), R3B1 (representados por cuadrados) y R3H3 (representados por trapecios) marcados con mAb anti-HA y estreptavidina-PE. La fluorescencia media para la unión de estreptavidina se monitorizó en el tiempo. La constante de velocidad de disociación se calcula a partir de la pendiente de la línea recta. La Fig. 8D muestra una serie de gráficas citométricas de dos campañas de selección utilizando Kingfisher en combinación con FACS (columna izquierda) o FACS sola (columna derecha). Las gráficas citométricas indican el porcentaje creciente de células de unión a antígeno en la ronda no seleccionada (a) y las rondas 1 (b) y 2 (c) de selección.

55 La Fig. 9 es un diagrama esquemático del vector de presentación en levadura de la cadena pesada, pTQ5-HC, con un inserto de fragmento de cadena pesada bajo el control de un promotor GAL1 inducible. El fragmento de cadena pesada de Ig se sitúa como un fragmento del inserto *Sfil/NotI*, y se expresa como una proteína de fusión unida a la superficie de la célula usando la secuencia señal Aga2p (Aga2p/ss) y anclando la subunidad de la proteína (proteína Aga2p). El fragmento de cadena pesada (HC) se fusiona a través de un marcador de epítipo myc. Igualmente, se indican otros elementos necesarios para la replicación de plásmidos (es decir, pMB1-ori y

60

Cen6/ARSH4), apareamiento de levaduras (*es decir*, el terminador $\text{Mat}\alpha$) y útiles como marcadores selectivos (*es decir*, *ampR* y *TRP*).

La Fig. 10 es una representación de una transferencia Western que demuestra la expresión del producto de fusión de 45 kD Aga2p-HC tal como se detecta con un anticuerpo anti-c-Myc en la célula parental de levadura haploide EBY100 pTQ5-HC (línea 2), en comparación con la célula hospedadora de levadura de vector vacío (control) EBY100 pTQ5 (línea 1) y la célula hospedadora de levadura de vector de presentación de Fab (estándar) EBY100 pTQF2 (línea 3).

La Fig. 11 es una serie de gráficas citométricas que muestran la presentación de HC en la superficie de células de levadura sin la presencia de una cadena ligera en tiempo igual a cero (*es decir*, líneas negras continuas del fondo) y 48 horas después de la inducción (líneas de puntos). Se marcaron células de levadura EBY100 pTQ5-HC y células de levadura de control EBY100 pTQ5 con anti- $\text{C}_\text{H}1$ y FITC anti-Ig de ratón de conejo para detectar la presencia de la HC, y también con estreptavidina FITC (strep-FITC) para detectar la actividad de unión a antígeno en la superficie de la levadura. La HC sólo se puede observar presentada en la superficie de la célula de levadura, pero carece de cualquier actividad de unión a antígeno en ausencia de una LC apareada.

La Fig. 12 es un diagrama esquemático del vector de expresión en levadura de cadena ligera, pTQ6-LC, que posee un inserto de cadena ligera bajo control de un promotor GAL1 inducible. La cadena ligera de Ig está situada como un fragmento de inserto *Apa*LI/*Ascl*, y se expresa como una proteína soluble usando la Aga2p/ss. El fragmento de cadena ligera (LC) se fusiona también con un marcador de epítipo HA. Se indican, igualmente, otros elementos de utilidad para la replicación de plásmidos (*por ejemplo*, pUC1-ori y Cen6/ARSH4) y útiles como marcadores de selección (*es decir*, *ampR* y Blastocidin®).

La Fig. 13 es una representación de una transferencia Western que demuestra la expresión del polipéptido de cadena ligera de 60 kD tal como se detecta en el sobrenadante del cultivo con un anticuerpo anti-HA en la célula parental de levadura haploide W303 pTQ6-LC (línea S2), comparada con la célula hospedadora de levadura de vector vacío (control) W303 pYC6 (línea S1).

La Fig. 14 es una gráfica de un histograma que ilustra la determinación por ELISA de células enteras de la actividad de unión de estreptavidina en la superficie celular de células de levadura parentales haploides (W303 pTQ6-LC y EBY100 pTQ5-HC), comparado con la célula de levadura diploide derivada (LC/HC DIPLOIDE) y la célula hospedadora de vector vacío de control W303 pYC6 y la célula hospedadora de levadura de vector de presentación de Fab estándar de célula hospedadora de levadura de vector de presentación EBY100 pTQ3-F2.

Las Figs. 15A-15C son una serie de histogramas FACS que muestran la unión a antígeno y la presentación de cadena ligera en una célula parental HC haploide anti-estreptavidina (A) y un control diploide que contiene plásmidos de expresión de LC y HC vacíos (B) y un diploide positivo que expresa un Fab específico de estreptavidina en su superficie (C).

La Fig. 16 es una representación de una transferencia Western que demuestra la expresión del polipéptido de LC de 30 kD, tal como se detecta con un anticuerpo anti-HA en la célula de levadura diploide formada por el apareamiento de EBY100 pTQ5-HC con W303 pTQ6-LC (línea 3), en comparación con la célula de levadura diploide (de control) formada por el apareamiento de EBY100 pTQ5 con W303 pYC6 (línea 2) y la célula hospedadora de levadura del vector de LC parental W303 pTQ6-LC (línea 1).

La Fig. 17 es una ilustración de una transferencia Western que demuestra la expresión del producto de fusión de 45 kD Aga2p-HC, como se detecta con un anticuerpo anti c-Myc en la célula de levadura diploide formada por el apareamiento de EBY100 pTQ5-HC con W303 pTQ6-LC (línea 5), en comparación con la célula de levadura diploide (de control) formada por apareamiento de EBY100 pTQ5 con W303 pYC6 (línea 4), la célula hospedadora de levadura del vector de HC parental EBY100 pTQ5-HC (línea 3), la célula hospedadora de levadura del vector de presentación de Fab estándar EBY100 pTQ3F2 (línea 2), y la célula hospedadora de levadura del vector vacío (control) EBY100 pTQ5 (línea 1).

Las Figs. 18A-18C son representaciones de la detección de inmunofluorescencia de anticuerpos Fab unidos de manera combinatoria en la superficie de células diploides de levadura (A) presentación de LC, (B) presentación de HC, (C) unión a antígeno. La fila superior muestra inmunofluorescencia, y la inferior muestra el contraste de fase.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación se da una descripción de realizaciones preferidas de la invención.

La invención que se detalla en la presente solicitud describe la primera demostración de la expresión, transporte, agrupamiento e inmovilización (o "presentación") satisfactoria de un polipéptido multicatenario heterólogo funcional (*por ejemplo*, fragmentos de anticuerpo Fab) en la superficie de una célula hospedadora eucariota (*por ejemplo*, levadura). La presente invención hace posible la construcción de bibliotecas de vectores y bibliotecas de células hospedadoras eucariotas, en las que las células presentan un repertorio altamente variable de polipéptidos

multicatenarios, los cuales muestran un alto grado de diversidad de secuencia dentro del repertorio, y, en consecuencia, un intervalo altamente variable de actividades biológicas tales como especificidad por una diana (*por ejemplo*, antígeno). El experto en la técnica podrá observar que, siguiendo las instrucciones de la presente invención, es posible expresar de manera estable una amplia selección de moléculas multicatenarias en la superficie de células hospedadoras eucariotas tales como levaduras.

Definiciones

A menos que se defina de otra forma en este documento, el lenguaje y la terminología usados en la descripción de la presente invención se utilizan con el significado habitual de dicho lenguaje y terminología, comprendido y aceptado en general por los expertos en la técnica. En un intento de evitar cualquier confusión o ambigüedad latente, se exponen a continuación elementos y características particulares tal como se refieren a la presente invención.

Como se usa en este documento, un “polipéptido multicatenario” se refiere a un polipéptido funcional compuesto por dos o más elementos polipeptídicos específicos (*es decir*, “cadenas”), unidos de forma covalente o no covalente entre sí por una asociación molecular diferente de la unión peptídica. Las cadenas de un polipéptido multicatenario pueden ser iguales o diferentes. Un ejemplo destacado de un polipéptido multicatenario es una inmunoglobulina (*por ejemplo*, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), compuesta típicamente por cuatro cadenas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que se combinan en un polipéptido multicatenario en el que las cadenas están unidas a través de varios enlaces disulfuro (covalentes). Los fragmentos Fab de inmunoglobulina activos, que implican una combinación de un dominio de cadena ligera (LC) y un dominio de cadena pesada (HC), constituyen una forma especialmente importante de polipéptidos multicatenarios. Además de formar un enlace disulfuro, las LC y HC de un Fab son conocidas también por asociarse de forma eficaz (de manera no covalente) en ausencia de cualquier puente disulfuro. Otros ejemplos de polipéptidos multicatenarios incluyen, pero sin limitación, los dominios extracelulares de moléculas del receptor de células T (TCR) (que comprenden cadenas α y β , o cadenas γ y δ), moléculas del MHC de clase I (que comprenden dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, asociados no covalentemente a microglobulina $\beta 2$), y moléculas del MHC de clase II (que comprenden cadenas α y β). En este documento se contempla específicamente la expresión de los dominios de unión TCR y MHC en la célula hospedadora eucariota, en la que al menos una cadena se ancla a la superficie de la célula hospedadora con un anclaje de origen no natural (heterólogo).

La expresión “biológicamente activo”, cuando se refiere, *por ejemplo*, a un polipéptido multicatenario, significa que el polipéptido muestra una funcionalidad o propiedad que resulta útil en relación con algún proceso, vía o reacción biológica. La actividad biológica se puede referir, *por ejemplo*, a una capacidad para interactuar o asociarse con (*por ejemplo*, unirse a) otro polipéptido o molécula, o puede hacer referencia a una capacidad para catalizar o regular la interacción de otras proteínas o moléculas (*por ejemplo*, reacciones enzimáticas). Actividad biológica puede referirse también a la capacidad para alcanzar una característica de conformación física de una estructura de origen natural tal como la conformación tetracatenaria de las moléculas de inmunoglobulina gamma (IgG) de origen natural, las cadenas α y β de una molécula del receptor de células T, o la conformación de una estructura presentadora de antígeno de un complejo mayor de histocompatibilidad (*por ejemplo*, el surco peptídico del MHC).

Como se usa en este documento, “vector” se refiere a cualquier elemento capaz de servir como vehículo de transferencia genética, expresión génica o replicación o integración de un polinucleótido extraño en una célula hospedadora. Un vector puede ser un cromosoma o plásmido artificial, y puede estar integrado en el genoma de la célula hospedadora o existir en forma de elemento genético independiente (*por ejemplo*, episoma, plásmido). Un vector puede existir como un único polinucleótido o como dos o más polinucleótidos distintos. Un “vector de presentación multicatenario” es capaz, en el hospedador apropiado, de dirigir la expresión de al menos una cadena de un polipéptido multicatenario y procesarla para la presentación en la superficie de dicho hospedador. Vectores pueden ser vectores de una sola copia o vectores de múltiples copias (que indica el número de copias del vector que se mantiene típicamente en la célula hospedadora). Vectores preferidos incluyen vectores de presentación en levadura, especialmente vectores 2μ y vectores centroméricos. En la técnica, se conoce como “vector lanzadera” (o vector bifuncional) cualquier vector capaz de replicarse en más de una especie de organismo. *Por ejemplo*, se puede construir un vector lanzadera capaz de replicarse tanto en *Escherichia coli* (*E. coli*) como en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) enlazando secuencias de un plásmido de *E. coli* con secuencias del plásmido 2μ de la levadura. Un vector especialmente preferido es un “vector de presentación dual”, que es un vector lanzadera capaz no sólo de replicarse en dos especies diferentes, sino también de expresar y presentar polipéptidos heterólogos en dos o más especies hospedadoras.

Como se usa en este documento, “secreción” se refiere a péptidos que tienen una señal de secreción y son procesados en el retículo endoplásmico. Si los péptidos segregados contienen secuencias de anclaje o se asocian con el exterior de la superficie celular, se dice que los péptidos se “presentan”. Tal como se usa en este documento, “presentación” y “presentación en superficie” (que se utilizan indistintamente en este documento) se refieren a un fenómeno en el que un polipéptido heterólogo está unido, o “anclado”, a la superficie exterior de un fago o célula hospedadora, por lo que el polipéptido anclado queda expuesto al entorno extracelular. La presente invención se refiere particularmente a la presentación de un polipéptido multicatenario en la superficie de una célula hospedadora eucariota, mediante la expresión de cada una de las cadenas en la célula hospedadora y el anclaje de al menos una cadena del polipéptido multicatenario a la superficie de la célula hospedadora. Un “vector de presentación” se refiere

a un vector que es capaz de expresar un polipéptido en una célula hospedadora o fago, de manera que el polipéptido expresado se presenta en la superficie de dicha célula hospedadora o fago. Los vectores de presentación dirigen la expresión de polipéptidos multicatenarios en una célula hospedadora o fago, de modo que en la superficie de la célula hospedadora o del fago se muestra la actividad biológica del polipéptido presentado. Los vectores de presentación dual dirigen la expresión de polipéptidos multicatenarios en al menos dos hospedadores diferentes (preferiblemente, *por ejemplo*, una célula hospedadora procariota y una célula hospedadora eucariota), de manera que la actividad biológica del polipéptido se muestra en la superficie de los hospedadores correspondientes.

El término “repertorio” se refiere a una población de diversas moléculas, *por ejemplo*, moléculas de ácido nucleico que difieren en la secuencia de nucleótidos, o polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos. De acuerdo con la presente invención, un repertorio de polipéptidos se diseña preferiblemente para que tenga una población diversa de moléculas que difieren en sus sitios de unión para una molécula diana. Los polipéptidos del repertorio se diseñan para que tengan elementos estructurales comunes, *por ejemplo*, como sucede con un repertorio de Fabs, que poseen una estructura bicatenaria bien reconocida (cadena ligera de Ig asociada con los dominios V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig) pero que muestran diferentes especificidades de unión debido a la variación en las regiones variables correspondientes de las cadenas componentes.

El término “biblioteca” se refiere a una mezcla de polipéptidos o polinucleótidos heterogéneos. Una biblioteca está compuesta por miembros que poseen secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas similares. Cuando la biblioteca es una biblioteca de polinucleótidos, codifica un repertorio de polipéptidos (particularmente, *por ejemplo*, en relación con la presente invención, un repertorio de polipéptidos multicatenarios). Las diferencias de secuencia entre los miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede adoptar la forma de una simple mezcla de polipéptidos o polinucleótidos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células de animales o vegetales y similares, que se transforman con una biblioteca de polinucleótidos. Cuando los polipéptidos heterogéneos se expresan y muestran en la superficie de las células u organismos que forman la biblioteca, se trata de una “biblioteca de presentación”. De manera conveniente, se incorporan polinucleótidos en los vectores de expresión con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una biblioteca puede adoptar la forma de una población de organismos hospedadores, conteniendo cada organismo una o múltiples copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de polinucleótido, que se puede expresar para producir el correspondiente miembro polipeptídico. De esta manera, la población de organismos hospedadores tiene el potencial de codificar un amplio repertorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas.

La presente descripción se refiere a nuevos vectores de presentación multicatenarios. En una realización, los polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multicatenario se hallan presentes en vectores de expresión distintos (*es decir*, dos o más), cuya compilación da lugar a un “conjunto de vectores” de presentación funcional (el término general “vector” comprende conjuntos de vectores). Por ejemplo, si el polipéptido multicatenario fuera un polipéptido bicatenario compuesto por la cadena ligera y la cadena pesada de un Fab biológicamente activo, el polinucleótido que codifica la LC se puede incorporar en un vector de expresión, y el polinucleótido que codifica la HC se puede incorporar en un segundo vector de expresión distinto (más preferiblemente, expresado como una proteína de fusión HC-anclaje). De manera individual, cada vector es capaz de expresar su cadena polipeptídica correspondiente; los dos vectores juntos forman un conjunto de vectores apareado, conjunto el cual codifica las cadenas de un polipéptido multicatenario biológicamente activo. De modo similar, células hospedadoras separadas, cada una de ellas transformada con los diferentes vectores de un conjunto de vectores, forman colectivamente un conjunto de células hospedadoras apareado (o específicamente en el caso de un conjunto de dos vectores, un “par de células” apareado). Los vectores y conjuntos de vectores incluirán también preferiblemente uno o múltiples marcadores seleccionables (*por ejemplo*, *TRP*, *ampR*, y similares) para facilitar la selección y propagación de hospedadores transformados con éxito.

Una “célula hospedadora” se refiere a cualquier célula (procariota o eucariota) transformada para contener un vector. Las células hospedadoras preferidas son células eucariotas, incluyendo células fúngicas. Las células hospedadoras pueden ser de cualquier construcción genética, pero preferiblemente son células diploides. Células hospedadoras preferidas incluyen células de levadura; especialmente, levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*). Ejemplos de especies de levadura preferidas incluyen *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Una célula hospedadora de levadura especialmente preferida es *S. cerevisiae*.

El término “fago” se refiere a un “bacteriófago”, que es un virus bacteriano que contiene un núcleo de ácido nucleico y una cubierta protectora proteínica. En este documento, los términos “bacteriófago” y “fago” se utilizan indistintamente. A menos que se señale lo contrario, los términos “bacteriófago” y “fago” comprenden también “fagómidos” (*es decir*, bacteriófago cuyo genoma incluye un plásmido que se puede empaquetar por co-infección de una célula hospedadora con un fago auxiliar). En realizaciones preferidas, el fago es un fago M13.

Las expresiones “anclaje”, “anclaje de superficie celular” y “polipéptido de anclaje” se refieren a un resto polipeptídico que, tras su expresión en una célula hospedadora, queda unido o asociado de otro modo con la superficie exterior de la célula hospedadora o, en el caso de un sistema de presentación en fago, en la superficie de

una partícula de fago (*por ejemplo*, como parte de la cápside o como parte de un filamento). Un polipéptido de anclaje puede ser un resto de proteína de cubierta, un resto de proteína transmembránica, o puede ser un resto polipeptídico unido de otra modo a la superficie celular (*por ejemplo*, a través de una modificación post-traducciona, tal como por un puente de fosfatidil-inositol o disulfuro). La expresión comprende proteínas nativas para la célula hospedadora o fago, o proteínas exógenas introducidas con el fin de anclarse a la pared de una célula hospedadora o a la cubierta de un fago. Los anclajes incluyen cualquier modificación o truncamiento sintético de un anclaje de origen natural que conserva todavía la capacidad para estar unido a la superficie de una célula hospedadora o de una partícula de fago. Restos de proteínas de anclaje preferidos están contenidos, *por ejemplo*, en las proteínas de la superficie celular de una célula eucariota. Anclajes eficaces incluyen partes de una proteína de la superficie celular suficientes para proporcionar un anclaje superficial cuando se fusionan a otro polipéptido, tales como una cadena de un polipéptido multicatenario de acuerdo con esta invención. También se contempla como anclaje adecuado el uso de pares de proteínas codificadas y expresadas por separado, pero que se asocian a la superficie de una célula por enlaces covalentes (*por ejemplo*, disulfuro) o no covalentes, y, en este sentido, se mencionan en particular los componentes α -aglutinina de la levadura, Aga1p y Aga2p, que forman un complejo unido por disulfuro e inmovilizado por glucanos sobre la superficie de las células de levadura. Otro par de proteínas que se puede utilizar como anclaje son proteínas que forman interacciones de “cremallera de leucina” y similares, tales como las proteínas nucleares Jun y Fos (que forman un “enlace jun/fos”). *Por ejemplo*, se puede diseñar un vector de presentación de acuerdo con esta invención para dirigir la expresión en una célula hospedadora de una primera cadena de un polipéptido multicatenario fusionada con el resto de la cremallera de leucina de Jun, y se puede diseñar un segundo vector para dirigir la expresión independiente del resto de la cremallera de leucina de Fos fusionado a una proteína de superficie del hospedador. Con la expresión de los genes estructurales del vector, el polipéptido de la primera cadena se asociará (*es decir*, quedará anclado) con la superficie de la célula hospedadora a través de un enlace jun/fos, dado que la cremallera de leucina de Jun y Fos forma un enlace entre el polipéptido de la primera cadena y la proteína de superficie de la célula hospedadora fusionada a la parte Fos de la cremallera. Se puede usar cualquier par de unión de proteínas apropiado. Los ejemplos preferidos de anclajes polipeptídicos incluyen la proteína de recubrimiento pIII del fago filamentoso o fragmentos de la misma (*por ejemplo*, dominio de anclaje pIII o “muñón”, véase la Patente de U.S nº 5.658.727) para sistemas de presentación en fago y para sistemas de presentación en levadura FLO1 (una proteína asociada con el fenotipo de floculación en *S. cerevisiae*), α -aglutinina y a-aglutinina (*por ejemplo*, subunidades de Aga1p y Aga2p) y fragmentos funcionales de las mismas.

Como se usa en este documento, la expresión “proteína de fusión” indica un polipéptido híbrido, compuesto por secuencias de aminoácidos de más de una fuente, unidas entre sí para formar un polipéptido unitario que no es de origen natural. Las proteínas de fusión se preparan, *por ejemplo*, uniendo operablemente en el marco secuencias codificantes para las secuencias de aminoácidos componentes, de modo que, con su expresión, se producen como un polipéptido único. De manera alternativa, las proteínas de fusión se pueden ensamblar de forma sintética, *por ejemplo* creando un enlace peptídico entre dos o más polipéptidos separados.

Como se usa en este documento, “enlazado” se refiere a una conexión funcional y estructural entre dos o más elementos. Como se utiliza en este documento, los elementos enlazados se refieren típicamente a una conexión operable entre dos o más elementos polinucleotídicos o polipeptídicos. *Por ejemplo*, tal como se ha analizado anteriormente, un polipéptido se puede enlazar a una proteína de anclaje (a través de un enlace peptídico o a través de un enlazador peptídico), formando de ese modo una proteína de fusión. De manera similar, los polinucleótidos que codifican el polipéptido y la proteína de anclaje pueden estar enlazados de forma que la proteína de fusión se transcribe y traduce como un mensaje de ARN unitario. Los polipéptidos también pueden estar unidos indirectamente a un anclaje a través de una asociación intermedia, un ejemplo de lo cual es el uso de la interacción de alta afinidad de las cremalleras de leucina Jun y Fos (*es decir*, un “enlace jun/fos”) para enlazar de forma eficaz un polipéptido a la superficie de un fago o una célula hospedadora (Cramer, R. y Blaser, K., 1996). Se puede utilizar cualquier par heterodimérico u homodimérico adecuado de moléculas (Chang, H. et al., 1994; Moll, J. et al., 2001; Pu, W. y Struhl, K., 1993).

Los especialistas en la técnica entenderán que los polinucleótidos, que codifican una o más cadenas de un polipéptido multicatenario que se tiene que expresar y presentar en un sistema de presentación en fago o de presentación en una célula hospedadora, pueden estar unidos operablemente a un promotor (para facilitar la transcripción) o unidos operablemente a una secuencia señal o péptido líder (para facilitar el procesamiento celular y el transporte a la superficie). Estos elementos de control genético y las uniones funcionales a los mismos son numerosos y bien conocidos en la técnica, y la presente invención no está limitada por su uso. Sin embargo, los promotores preferidos incluyen promotores inducibles. Promotores especialmente preferidos (para sistemas eucariotas) incluyen los que son útiles en vectores de levadura, tales como pGAL1, pGAL1-10, pGAL1104, pGAL10, pPGK, pCYC1 y pADH1. Otros promotores preferidos incluyen el promotor LacZ (para sistemas no eucariotas). Las secuencias señal especialmente preferidas incluyen la secuencia señal Aga2p (para sistemas eucariotas) y la secuencia señal pIII (para sistemas no eucariotas).

Otra herramienta de utilidad conocida por los especialistas en la técnica son las etiquetas moleculares o “marcadores” (*por ejemplo*, marcadores de epítipo, genes informadores, radioisótopos, restos fluorescentes o quimioluminiscentes, etc.), que facilitan la capacidad del facultativo para detectar, *por ejemplo*, la presencia de un polipéptido enlazado a las mismas. Los marcadores de epítipo (*por ejemplo*, segmentos de péptidos conocidos por

ser reconocidos por anticuerpos particulares o restos de unión) son especialmente útiles en este documento, en el sentido de que se pueden coexpresar como una pareja de fusión con una o más cadenas de un polipéptido multicatenario en un vector o vectores, para permitir la detección de la expresión de una o más cadenas con las que se coexpresa el marcador. Tal como se conoce y utiliza en la técnica, los marcadores se sitúan típicamente bajo los mismos controles genéticos como un gen de interés (preferiblemente como un componente de una proteína de fusión expresada). Si y cuando el producto génico de interés no se puede detectar fácilmente, el marcador proporciona una señal fácilmente detectable y, a menudo cuantificable, que indica la presencia del producto génico de interés. Mediante la unión de un marcador a un producto génico polipeptídico de interés, el facultativo puede monitorizar procesos tales como, por ejemplo, expresión génica, tráfico de polipéptidos, presentación extracelular e interacciones proteína-proteína (Fields, S. y Sternglanz, R., 1994; Phizicly, E. y Fields, S., 1995).

En consecuencia, las cadenas de un polipéptido multicatenario pueden estar opcionalmente enlazadas a uno o más marcadores, ya sea individual o conjuntamente. En la técnica se conoce una diversidad de marcadores, y están disponibles comercialmente (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Applied Biosystems, Foster City, CA; Promega, Madison, WI; Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN; Stratagene, La Jolla, CA). Preferiblemente, la unión se consigue a través de un enlace peptídico (creando de esta forma una proteína de fusión), en el que el polinucleótido que codifica una cadena de un polipéptido multicatenario se une a un marcador (por ejemplo, un marcador de epítipo). Los marcadores preferidos incluyen marcadores poli-His, marcadores HA y marcadores myc.

Como se usa en este documento, el término “recombinante” se utiliza para describir ácidos nucleicos alterados o manipulados de forma no natural, células hospedadoras transfectadas con ácidos nucleicos exógenos, o polipéptidos expresados de manera no natural, a través de la manipulación de ADN aislado y la transformación de células hospedadoras. “Recombinante” es un término que comprende específicamente moléculas de ADN que se han construido *in vitro* usando técnicas de ingeniería genética, y el uso del término “recombinante” como adjetivo para describir una molécula, construcción, vector, célula, polipéptido o polinucleótido excluye específicamente las moléculas de origen natural.

Del mismo modo, el término “transformar” se refiere en general a cualquier método artificial (*es decir*, controlado por el facultativo) para introducir material genético en una célula o fago, sin limitación del método de inserción. En la técnica se conocen y describen numerosos métodos mediante las referencias citadas. De manera específica como se aplica a la presente invención, el término “transformante” se refiere a una célula hospedadora que se ha transformado y comprende, por ejemplo, células diploides, que son el producto de la fusión controlada de pares de células haploides apareados (tal como sucede con el apareamiento controlado de esporas haploides de levadura de tipo de apareamiento opuesto).

Los métodos para “transferir” información sobre secuencias de ácido nucleico de un vector a otro no representan una limitación, e incluyen una diversidad de técnicas de ingeniería genética o ADN recombinante conocidas en la técnica. Una vez más, se conoce en la técnica una extensa gama de métodos, y se describen en las referencias citadas en este documento. Las técnicas de transferencia especialmente preferidas incluyen, pero sin limitación, técnicas de digestión por restricción y de ligación (que utilizan sitios de clonación únicos), protocolos de amplificación por PCR (que utilizan secuencias de cebador específicas) y técnicas de recombinación homóloga (que utilizan regiones polinucleotídicas de homología).

El uso de la tecnología de ingeniería genética requiere necesariamente el cultivo de células hospedadoras recombinantes (transformantes) en diversas condiciones especificadas, tal como se determina por las necesidades del organismo y el estado celular particular que desea el facultativo. Por ejemplo, el organismo puede poseer (de acuerdo con lo determine su disposición genética) ciertos requisitos nutricionales o una resistencia o sensibilidad particular frente a condiciones físicas (*por ejemplo*, temperatura) y/o químicas (*por ejemplo*, antibióticos). Además, pueden ser necesarias condiciones especiales de cultivo para inducir o reprimir la expresión de un gen deseado (*por ejemplo*, uso de promotores inducibles) o para iniciar un estado celular particular (*por ejemplo*, apareamiento o esporulación de células de levadura). Estas diversas condiciones y los requisitos para satisfacer tales condiciones son conocidos y comprendidos por los especialistas en la técnica.

En consecuencia, la práctica de distintos aspectos de la presente invención exige el cultivo de células hospedadoras en “condiciones apropiadas” o “condiciones suficientes” para lograr o inducir estados celulares determinados. Dichos estados celulares deseables incluyen, pero sin limitación: crecimiento y reproducción celular; la expresión, secreción o transporte, y asociación de las cadenas de un polipéptido multicatenario de manera que la actividad biológica del polipéptido multicatenario se muestre en la superficie de la célula hospedadora (o partícula de fago); la fusión de células haploides para formar una célula diploide (por ejemplo, fertilización, formación de cigoto, apareamiento de células de tipos de apareamiento opuestos); y la meiosis de una célula diploide para formar células hijas haploides (*por ejemplo*, gametogénesis, esporulación). La presente invención no está limitada por los parámetros físicos y químicos de dichas “condiciones apropiadas”, pero las citadas condiciones están determinadas por los organismos y vectores usados para poner en práctica la invención, así como por las preferencias del facultativo.

Vectores de presentación eucariotas de polipéptido multicatenario

Tal como se ha indicado anteriormente, la presente descripción se refiere a un nuevo vector genético, de utilidad en una célula eucariota para presentar un polipéptido multicatenario en la superficie de la célula, de modo que se muestre la actividad biológica del polipéptido multicatenario en la superficie de la célula. El polipéptido multicatenario se puede codificar en un único vector, o las cadenas individuales del polipéptido multicatenario se pueden codificar un conjunto de vectores. Por ejemplo, el vector puede estar presente como un conjunto de vectores, en el que cada cadena del polipéptido multicatenario está codificada por uno de un par correspondiente de vectores, de manera que cuando el conjunto de vectores está presente en una única célula eucariota, las cadenas del polipéptido multicatenario se asocian en la superficie de la célula eucariota. El vector de presentación puede ser un vector de presentación dual, en el que el vector es capaz de (i) expresarse en una célula eucariota y presentar en la superficie de la célula eucariota un polipéptido multicatenario biológicamente activo, y (ii) expresarse en una célula eucariota y presentar en la superficie de un bacteriófago el polipéptido multicatenario biológicamente activo.

El polipéptido multicatenario puede ser cualquier polipéptido compuesto por dos o más elementos polipeptídicos separados, a los que se denomina cadenas del polipéptido multicatenario, cadenas las cuales están unidas covalente o no covalentemente (por una unión diferente de la peptídica) para formar un polipéptido biológicamente activo. Preferiblemente, el polipéptido multicatenario codificado por el vector o los vectores de presentación multicatenarios existe como un polipéptido de dos, tres o cuatro cadenas. Las cadenas del polipéptido pueden ser idénticas (*por ejemplo*, un homodímero, -trímero o -tetrámero) o diferentes (*por ejemplo*, un heterodímero, -trímero o -tetrámero). Preferiblemente, el polipéptido multicatenario es un polipéptido de dos o cuatro cadenas compuesto por dos cadenas diferentes. Más preferiblemente, el polipéptido multicatenario se selecciona de un grupo de polipéptidos multicatenarios que consisten en receptores de células T, moléculas del MHC clase I, moléculas del MHC clase II, inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulinas biológicamente activos (*por ejemplo*, Fab). Más preferiblemente, el polipéptido multicatenario es una IgA, IgD, IgE, IgG, IgM o un fragmento biológicamente activo de las mismas. Más preferiblemente, el polipéptido multicatenario es un fragmento Fab de una Ig, en el que el primer polinucleótido del vector de presentación multicatenario comprende un segmento que codifica los dominios V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig, y un segundo polinucleótido comprende un segmento que codifica una cadena ligera de Ig (es decir, dominios V_L y C_L).

Las cadenas del polipéptido multicatenario (*por ejemplo*, primera cadena, segunda cadena, tercera cadena, etc.) se codifican como polinucleótidos (*por ejemplo*, primer polinucleótido, segundo polinucleótido, tercer polinucleótido, etc., respectivamente) en un vector de expresión. Los especialistas en la técnica apreciarán y reconocerán que las secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas no necesariamente tienen que estar insertadas en el plásmido idéntico o bajo el mismo control de expresión génica, para producir un polipéptido multicatenario funcional. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de un Fab de Ig pueden estar localizados en plásmidos distintos y transformarse como tales en una célula hospedadora idéntica para la co-expresión y co-procesamiento en un polipéptido multicatenario funcional.

Los especialistas en la técnica apreciarán igualmente que las secuencias de los polinucleótidos que codifican las cadenas de un polipéptido multicatenario no necesitan originarse a partir de una fuente idéntica o de la misma fuente. Por ejemplo, se puede producir una molécula de Ig que tiene dominios variables (V_H y V_L) iguales a los de un anticuerpo monoclonal que posee una especificidad deseada, y dominios constantes (C_H1 y C_L) de un anticuerpo monoclonal diferente, que posee propiedades deseadas (*por ejemplo*, otorgar compatibilidad humana o proporcionar un sitio de unión particular del complemento).

Adicionalmente, el polinucleótido heterólogo que codifica las cadenas de un polipéptido multicatenario (*por ejemplo*, dominios de Ig) puede estar variegado, para producir una familia de homólogos polinucleotídicos que codifican cadenas polipeptídicas que varían ligeramente en las secuencias de aminoácidos de una a otra, aunque tienen la misma estructura general. De esta forma, cuando los homólogos se incorporan a diferentes células hospedadoras y se expresan, se presenta una biblioteca de polipéptidos multicatenarios de secuencias variadas, que proporcionan una biblioteca de presentación de péptidos adecuada para la identificación, por ejemplo, para descubrir polipéptidos multicatenarios homólogos que tienen actividad biológica alterada. Dichas alteraciones en la secuencia de aminoácidos se pueden conseguir mediante mutaciones adecuadas o síntesis parcial y reemplazo o sustitución parcial o completa de regiones apropiadas de las secuencias codificantes polinucleotídicas correspondientes. Es posible obtener partes sustituidas de dominios constantes a partir de secuencias compatibles de ADN recombinante.

Dada una selección adecuada de componentes de vectores de expresión y células hospedadoras compatibles, las cadenas del polipéptido multicatenario se expresarán en la superficie de células hospedadoras eucariotas. Los especialistas en la técnica apreciarán que esto se puede lograr usando cualquiera de una serie de construcciones de vectores de expresión variables y que la presente invención no está limitada por las mismas. El vector de presentación en sí mismo se puede construir o modificar a partir de cualquiera de una serie de vectores genéticos y elementos de control genético conocidos en la técnica y disponibles comercialmente (*por ejemplo*, de InVitrogen (Carlsbad, CA); Stratagene (La Jolla, CA); Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas VA)). Básicamente, la construcción del vector expresa las cadenas polipeptídicas para la presentación eficaz de un polipéptido multicatenario totalmente ensamblado en la superficie de una célula eucariota transformada con el vector, de modo que se muestre la actividad biológica del polipéptido multicatenario en la superficie de la célula hospedadora.

Para lograr una expresión celular eficaz del polipéptido multicatenario, los polinucleótidos que codifican cada una de las cadenas del polipéptido multicatenario están enlazados, preferiblemente, a un promotor de transcripción para regular la expresión de las cadenas polipeptídicas. El promotor eficaz debe ser funcional en un sistema eucariota y, opcionalmente (particularmente, en el caso de un vector de presentación dual), también debe ser eficaz como promotor procariota. En un vector de presentación dual particular, el promotor o los promotores eucariotas y el promotor o los promotores procariotas seleccionados para regular la expresión de las cadenas polipeptídicas heterólogas de un polipéptido multicatenario pueden ser promotores idénticos o diferentes, con la condición de que sean apropiadamente funcionales en los organismos hospedadores pretendidos. De manera alternativa, se les puede seleccionar independientemente para la expresión de cada cadena en un hospedador particular. El promotor eucariota puede ser un promotor constitutivo, pero es preferiblemente un promotor inducible. Con el fin de conseguir una expresión equilibrada y garantizar la inducción simultánea de la expresión, se prefiere una construcción de vector que utilice el mismo promotor para cada cadena.

En la técnica se conoce una serie de promotores eucariotas que son útiles en la presente invención. Promotores especialmente preferidos (para sistemas eucariotas) incluyen los que son útiles en vectores de expresión en levaduras tales como los promotores inducibles por galactosa, pGAL1, pGAL1-10, pGal4 y pGal10; el promotor de fosfoglicerato-cinasa, pPGK; promotor del citocromo c, pCYC1; y el promotor de alcohol deshidrogenasa 1, pADH1.

Preferiblemente, cada uno de los polinucleótidos que codifica una cadena de un polipéptido multicatenario está enlazado también a una secuencia señal (o una secuencia de péptido líder). La secuencia señal actúa para dirigir el transporte (a veces denominado secreción) de un polipéptido naciente en o a través de una membrana celular. Las cadenas de un polipéptido multicatenario expresado en una célula eucariota a partir de un vector son transportadas al retículo endoplásmico (ER) para su ensamblaje y transporte hacia la superficie celular para su presentación extracelular. Una secuencia señal eficaz debería ser funcional en un sistema eucariota y, opcionalmente (especialmente en el caso de un vector de presentación dual), debería ser eficaz también en un sistema procariota. Los polinucleótidos que codifican las cadenas de un polipéptido multicatenario típicamente están enlazados directamente, en marco (ya sea inmediatamente adyacentes al polinucleótido u, opcionalmente, enlazados a través de una secuencia enlazadora o espaciadora), a una secuencia señal, generando así una proteína de fusión de cadena polipeptídica-péptido de secuencia señal. Preferiblemente, cada cadena de un polipéptido multicatenario está fusionada a un péptido señal distinto.

La secuencia señal que codifica el péptido señal puede ser idéntica o diferente para cada cadena del polipéptido multicatenario. La secuencia señal puede ser nativa para el hospedador o heteróloga, siempre que sea operable para determinar el transporte extracelular del polipéptido al que se fusiona. Los especialistas en la técnica conocen varias secuencias señal operables en la presente invención (*por ejemplo*, las secuencias señal Mf α 1 prepro, Mf α 1 pre, fosfatasa ácida Pho5, Invertasa SUC2, operables en levadura. Las secuencias señal se obtienen preferiblemente de proteínas secretoras nativas de la célula hospedadora. Las secuencias señal de eucariotas especialmente preferidas incluyen las de un factor α de apareamiento de levadura; α -aglutinina de levadura, invertasa de *Saccharomyces*, inulinasa de *Kluyveromyces*, y, lo más preferible, el péptido señal de la subunidad Aga2p de la α -aglutinina (especialmente en realizaciones en las que el polipéptido de anclaje que se utiliza es el polipéptido Aga2p).

En una realización particularmente preferida, en la que el polipéptido multicatenario es un Fab, el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica las regiones V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig, y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica una cadena ligera de Ig.

El vector de presentación eucariota multicatenario opera en una célula hospedadora eucariota de manera que el polipéptido multicatenario codificado por el vector se presenta en la superficie de la célula hospedadora. El anclaje ("adhesión" o "presentación") en la superficie de la célula hospedadora se logra enlazando al menos una cadena del polipéptido multicatenario a un resto molecular unido a pared de la célula hospedadora. Más de una cadena de un polipéptido multicatenario puede estar unida a un anclaje, pero debido a que el polipéptido multicatenario completamente ensamblado requiere (y, preferiblemente contiene) solamente un punto de unión a la superficie de la célula hospedadora, solamente una cadena del polipéptido multicatenario necesita ser el punto de unión celular. La presentación en la superficie de la célula se puede lograr enlazando al menos una de las cadenas polipeptídicas a una proteína de anclaje o un fragmento funcional (resto) de la misma. El anclaje eficaz debería ser funcional en un sistema eucariota y, opcionalmente (particularmente en el caso de un vector de presentación dual), el anclaje debería ser eficaz también sobre la superficie de un bacteriófago. Preferiblemente, el anclaje es una proteína expresada en la superficie nativa a la célula hospedadora, *por ejemplo* una proteína transmembránica o una proteína enlazada a la superficie celular a través de un puente de glicano. Los especialistas en la técnica conocen varias proteínas de anclaje operables en la presente invención (*por ejemplo*, pIII, pVI, pVIII, LamB, PhoE, Lpp-OmpA, Flagelina (FliC) o, al menos, sus porciones transmembránicas, operables en procariotas/fago; el dominio transmembránico del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI), operables en células de mamífero; anclaje gp64 en células de insecto, y similares). Preferiblemente, cuando el hospedador es una levadura, la proteína de anclaje es α -aglutinina, α -aglutinina (con los subcomponentes Aga1p y Aga2p), o FLO1, que forman naturalmente un enlace con la superficie celular de la levadura.

El enlace de una cadena polipeptídica a un anclaje se puede conseguir, directa o indirectamente, por una diversidad de técnicas de biología molecular. La presente invención no está limitada por el método de enlazamiento de cadena-anclaje, sólo por el requisito funcional de que la cadena polipeptídica enlazada esté inmovilizada sobre la superficie de la célula hospedadora (u opcionalmente del bacteriófago) como resultado de dicho enlazamiento.

5 Un método preferido de enlazamiento de cadena-anclaje es a través de la construcción de una proteína de fusión de cadena-anclaje. De manera similar y, preferiblemente, en concordancia con una proteína de fusión de cadena-péptido señal, un polinucleótido que codifica una cadena de un polipéptido multicatenario está enlazado directamente, en marco (ya sea inmediatamente adyacente al polinucleótido u, opcionalmente, enlazado a través de una secuencia enlazadora o espaciadora), a un anclaje, generando de esta forma una proteína de fusión de péptido
10 señal-cadena polipeptídica-anclaje.

En la técnica se conocen modos alternativos de enlazamiento péptido-péptido, y están disponibles para lograr un enlazamiento cadena-anclaje eficaz de la presente invención. Por ejemplo, y como se ha citado anteriormente, una cadena del polipéptido multicatenario puede estar enlazada indirectamente a un anclaje a través de una asociación intermedia tal como una interacción de alta afinidad de las cremalleras de leucina Jun y Fos (ligadura jun/fos) para enlazar de forma covalente una cadena polipeptídica a un anclaje de un fago o célula hospedadora (Cramerí, R. y Suter, M., 1993; Cramerí, R. y Blaser, K., 1996).
15

En la realización particularmente preferida, en la que el polipéptido multicatenario es un fragmento Fab de Ig: el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica un anclaje Aga2p, y en marco con un segmento que codifica los dominios V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig; y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica una cadena Ig ligera.
20

Preferiblemente, los vectores de presentación multicatenarios ofrecen sitios de clonación para facilitar la transferencia de las secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas de un polipéptido multicatenario. Estos sitios de clonación de vector comprenden al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción, situado para facilitar la escisión e inserción, en el marco de lectura, de segmentos polinucleotídicos. Se puede utilizar cualquiera de los sitios de restricción conocidos en la técnica en la construcción del vector de la presente invención. La mayoría de los vectores comercialmente disponibles ya contienen múltiples sitios de clonación (MCS) o regiones de poliligadores. Además, se conocen técnicas de ingeniería genética que son de utilidad para incorporar sitios de restricción nuevos y únicos en un vector, y estos métodos son aplicados normalmente por los expertos en la técnica. Un sitio de clonación puede comprender hasta un único sitio de restricción de endonucleasas de reconocimiento, para permitir la inserción o escisión de un único fragmento polinucleotídico. Más típicamente, se emplean dos o más sitios de restricción para proporcionar un mayor control de, por ejemplo, la inserción (*por ejemplo*, dirección de inserto) y una mayor flexibilidad de operación (*por ejemplo*, la transferencia dirigida de más de un fragmento polinucleotídico). Sitios de restricción múltiples pueden ser sitios de restricción idénticos o diferentes.
25
30

El vector de presentación eucariota multicatenario contiene preferiblemente sitios de restricción situados en los extremos de las secuencias codificantes para las cadenas del polipéptido multicatenario. Los sitios de restricción pueden estar situados en los extremos terminales 5' y 3' del segmento polinucleotídico, incluyendo todas las secuencias codificantes para las cadenas de un polipéptido multicatenario (en un único vector); o, más preferiblemente, los sitios de restricción pueden estar situados en los extremos 5' y 3' de cada segmento polinucleotídico que codifica una cadena del polipéptido multicatenario. Lo más preferible, cada uno de los sitios de restricción es único en el vector y diferente de los restantes sitios de restricción. Esta construcción de vector especialmente útil proporciona flexibilidad y control para la transferencia modular de secuencias polinucleotídicas individuales que codifican una cadena de un polipéptido multicatenario.
35
40

En una construcción de vector especialmente preferida, en la que el polipéptido multicatenario es un Fab, el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica un anclaje Aga2p, y en marco con un segmento que codifica las regiones V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig, en el que la región de cadena pesada de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (*por ejemplo*, *SfiI* y *NotI*); y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica una cadena ligera de Ig, en el que la región de cadena ligera de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (*por ejemplo*, *ApaI* y *AscI*).
45

En una realización preferida del vector de presentación eucariota multicatenario, una o más de las cadenas del polipéptido multicatenario expresado por el vector en una célula hospedadora están enlazadas a un marcador molecular o gen informador. Preferiblemente, la ligadura es un enlace peptídico que une un marcador polipeptídico a una cadena del polipéptido multicatenario. Una o más cadenas del polipéptido multicatenario pueden estar marcadas usando marcadores idénticos, similares o diferentes. Los marcadores preferidos incluyen marcadores de epítipo (Munro, S. y Pelham, H., 1987). marcadores de epítipo preferidos incluyen marcadores poliHis, marcadores HA y marcadores myc, y preferiblemente cada cadena está fusionada a un marcador diferente.
50
55

Basándonos en la construcción de vector especialmente preferida ejemplificada en este documento, en la que el polipéptido multicatenario es un fragmento Fab de una inmunoglobulina, el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica un anclaje Aga2p, en marco con un segmento que

codifica las regiones V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig, y en marco con un segmento que codifica un marcador myc, en el que la región de la cadena pesada de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (por ejemplo, *SfiI* y *NofI*); y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en marco con un segmento que codifica un marcador HA, y en marco con un segmento que codifica una cadena ligera de Ig, en el que la región de la cadena ligera de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (por ejemplo, *ApaI* y *AsclI*).

Presentación en una célula eucariota de un polipéptido multicatenario

Mediante el uso del vector descrito y mostrado en este documento, se pone de manifiesto por primera vez un procedimiento para presentar un polipéptido multicatenario biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota. El procedimiento para presentar un polipéptido multicatenario en la superficie de una célula hospedadora eucariota comprende introducir el vector (posiblemente en forma de un conjunto de vectores) en una célula eucariota (*es decir*, una célula hospedadora), y cultivar la célula hospedadora en condiciones apropiadas para la expresión, transporte y asociación de las cadenas del polipéptido multicatenario con la superficie de la célula hospedadora, de manera que en la superficie de dicha célula hospedadora se muestra la actividad biológica del polipéptido multicatenario.

La forma de introducir el vector en una célula hospedadora no es limitante para la presente invención, e incluye cualquier método para introducir material genético en una célula ya conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin estar limitados a ellos, métodos conocidos y a los que se hace referencia en la técnica como transfección, transformación, electroporación, transferencia mediada por liposomas, transferencia biolística, conjugación, fusión celular y microinyección nuclear. Los métodos de transformación son conocidos en la técnica y son los preferidos para la transferencia genética.

Células hospedadoras (y pares de células hospedadoras) de presentación de polipéptidos multicatenarios

Los vectores son operables en una célula hospedadora eucariota para producir la expresión y presentar un polipéptido multicatenario en la superficie de la célula hospedadora eucariota. Opcionalmente, y particularmente en el caso de vectores de presentación dual, los vectores son operables también en una célula hospedadora procariota para producir la expresión en una célula hospedadora bacteriana y presentar un polipéptido multicatenario en la superficie de un bacteriófago. La célula hospedadora eucariota puede ser cualquier célula eucariota de cualquier genotipo, diferenciada o sin diferenciar, unicelular o multicelular, dependiendo del interés del especialista y de los requisitos. Células eucariotas especialmente útiles incluyen células fúngicas. Preferiblemente, la célula hospedadora es un organismo no diferenciado, unicelular y haploide o diploide. Las células fúngicas hospedadoras preferidas incluyen las diversas levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Debaryomyces* y *Candida*. La especie muy particularmente preferida es *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan), tal vez el sistema de célula eucariota mejor conocido, caracterizado y utilizado en la investigación de biología molecular.

En realizaciones particulares, las células hospedadoras eucariotas son adecuadas para la fusión celular (véase más adelante). Por ejemplo, células de levadura de tipo de apareamiento opuesto pueden ser "apareadas" para producir células diploides fusionadas. Además, los protoplastos o esferoplastos de levadura apropiados para la fusión celular son también células hospedadoras eucariotas adecuadas a los efectos de la invención. De manera alternativa, las células que crecen en cultivo (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, etc.) se pueden fusionar por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un virus Sendai o corriente eléctrica).

Sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota

Los avances técnicos de la presente invención para presentar polipéptidos multicatenarios complejos en la superficie de una célula hospedadora eucariota se pueden combinar con el poder de la tecnología de presentación en fagos. Por ejemplo, utilizando un sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota como se describe en este documento, los especialistas pueden combinar, por primera vez, la enorme diversidad proporcionada por las bibliotecas de presentación en fago y de la tecnología de presentación en fagos con la expresión, procesamiento, ensamblaje y expresión celulares que ofrece la tecnología de presentación eucariota multicatenaria anteriormente mencionada. La transferencia de información de una secuencia de ácido nucleico entre un vector de presentación en fago y el vector eucariota se puede conseguir por medio de diversos métodos de transferencia genética conocidos en la técnica (*por ejemplo*, tecnología de ingeniería genética tal como la tecnología de ADN recombinante). Formas preferidas de transferencia incluyen técnicas de digestión por restricción, amplificación por PCR, o recombinación homóloga.

En una realización, se emplea un vector lanzadera de presentación eucariota/procariota multicatenario, tal como se ha descrito y mostrado en este documento. Los elementos de control genético del vector de presentación dual determinan, en una célula hospedadora eucariota, la expresión, procesamiento, ensamblaje y presentación de un polipéptido multicatenario biológicamente activo en la superficie de la célula hospedadora eucariota transformada con el vector de presentación dual, a la vez que, en la célula hospedadora procariota, determinan la expresión, procesamiento, ensamblaje y presentación de un polipéptido multicatenario biológicamente activo en la superficie de un bacteriófago infectado en la célula hospedadora procariota.

En otra realización, el sistema de transferencia presentación en fagos-presentación eucariota se lleva a cabo insertando segmentos polinucleotídicos codificantes de cadena escindidos de un vector de presentación en fagos convencional (*es decir*, un bacteriófago tratado para presentar un polipéptido exógeno en la superficie de la partícula del fago), conocido en la técnica, en el vector de presentación eucariota multicatenario, permitiendo de este modo la expresión de los segmentos codificantes de cadena, y el procesamiento, ensamblaje y presentación eucariotas de un polipéptido multicatenario biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota transformada con el vector de presentación eucariota. Tal como se ha descrito anteriormente, la transferencia de las secuencias polinucleotídicas desde un vector de presentación en fagos a un vector de presentación eucariota multicatenario se puede lograr por cualquier método de ingeniería genética conocido en la técnica. Dos métodos especialmente preferidos incluyen un método de transferencia de escisión/inserción única y un método de transferencia de escisión/inserción múltiple (o modular).

En un procedimiento de transferencia con escisión/inserción única, los segmentos polinucleotídicos que codifican las cadenas de un polipéptido multicatenario se escinden (por ejemplo, por digestión de restricción) del vector de presentación en fago en forma de un único ácido nucleico unitario y, subsiguientemente, se inserta en el vector de presentación multicatenario. Una vez insertado en el vector de presentación eucariota, los elementos de control genético procariotas no deseados (si hay alguno), situados entre los polinucleótidos codificantes de cadena, son sustituidos por elementos de control genético eucariotas. Este proceso se representa en forma de diagrama en la Fig. 1 para un polipéptido multicatenario de Fab de Ig, transferido desde un vector de presentación en fago a un vector de presentación en levadura multicatenario especialmente preferido.

De manera alternativa, segmentos polinucleotídicos que codifican cadenas de un polipéptido multicatenario se escinden individualmente desde un vector de presentación en fagos y subsiguientemente se insertan en el vector de presentación multicatenario de forma separada e independiente. Este enfoque ofrece un mayor control y flexibilidad con respecto a la transferencia de cadenas individuales de un polipéptido multicatenario, por separado o de modo masivo. De hecho, dependiendo de los intereses y necesidades del especialista, sólo es necesario transferir cadenas seleccionadas del polipéptido multicatenario. Este procedimiento aparece representado como diagrama para un polipéptido multicatenario de Fab de Ig en la Fig. 2.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota que se describe y muestra en este documento es igualmente funcional tanto si se transfiere información de secuencias desde un vector de presentación en fagos a un vector de presentación eucariota multicatenario como desde un vector de presentación eucariota multicatenario a un vector de presentación en fagos; *es decir*, el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota es efectivamente bidireccional. Una biblioteca de presentación en fagos especialmente preferida para utilizar en el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota es una gran biblioteca de fragmentos Fab humanos (de Haard, H. et al., 1999).

Bibliotecas de presentación eucariota multicatenario y su protocolo de identificación

Los vectores de presentación eucariotas multicatenarios y las células hospedadoras transformadas con estos vectores, de manera que en la superficie de la célula hospedadora se presenta un polipéptido multicatenario biológicamente activo, son de utilidad para la producción de bibliotecas de presentación. Por su parte, estas bibliotecas de presentación son útiles para identificar una diversidad de actividades biológicas de interés para el especialista, por ejemplo, la identificación frente a cualquiera de una serie de moléculas diana para identificar polipéptidos de unión específicos para esa diana.

Existen diversos métodos para expresar una serie variable de moléculas en la superficie de una célula hospedadora o fago. Las bibliotecas de presentación en fagos, y su identificación, representan una herramienta importante en investigación y desarrollo. Los métodos para producir e identificar bibliotecas de presentación en fagos son bien conocidos y utilizados en la técnica (Hoogenboom, H. et al., 1997; Kay et al., 1996; Ladner, R. et al., 1993).

Los vectores de presentación eucariotas y multicatenarios se pueden usar para generar nuevas bibliotecas peptídicas *de novo*, similares a las bibliotecas de presentación en fago conocidas. Sin embargo, los vectores descritos en este documento permiten una expresión más eficaz de polipéptidos multicatenarios adecuadamente plegados, ensamblados, glicosilados y presentados, tal como se puede lograr únicamente en un sistema eucariota. Estas bibliotecas de presentación eucariotas multicatenarias se pueden utilizar entonces en ensayos de identificación. Las personas con cierta experiencia en la técnica podrán apreciar y adaptarán con facilidad los protocolos de identificación de bibliotecas de presentación conocidos en la técnica (*por ejemplo*, ensayos de identificación de presentación en fagos) a las bibliotecas de presentación eucariotas multicatenarias de la presente descripción.

Además de generar nuevas bibliotecas de presentación eucariotas multicatenarias *de novo*, la presente descripción permite además al especialista transferir bibliotecas de presentación en fago ya existentes al sistema de presentación eucariota multicatenario que se describe y muestra en este documento. De manera particular, el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota permite construir una biblioteca de presentación en fagos para la presentación de un repertorio muy amplio de polipéptidos multicatenarios; por

ejemplo, Fabs, que tienen componentes de cadena ligera y de cadena pesada. La biblioteca de presentación en fagos, que pueden tener una diversidad de $>1 \times 10^8$ (preferiblemente $>1 \times 10^9$, más preferiblemente $>1 \times 10^{10}$) polipéptidos multicatenarios en una biblioteca, puede someterse a una identificación inicial, produciendo una subpoblación de menos de aproximadamente 1×10^7 (preferiblemente entre 1×10^5 y 1×10^6) aislados de presentación en fagos. Los polinucleótidos que codifican las cadenas de los aislados de polipéptidos multicatenarios pueden ser transferidos, seguidamente, de manera discontinua a un vector de presentación eucariota multicatenario para la transformación en un hospedador eucariota. Los polipéptidos multicatenarios presentados en células hospedadoras eucariotas se pueden identificar y manipular adicionalmente, aprovechando las condiciones de cultivo y las calidades de expresión del sistema hospedador eucariota, tal como se ha analizado anteriormente (por ejemplo, plegamiento de proteínas, asociación apropiada de cadenas separadas en la proteína multicatenaria, glicosilación, secreción y modificaciones post-traduccionales tales como enlaces de fosfatidil inositol a la membrana celular). Además, una vez insertada en el vector de presentación eucariota multicatenario, la biblioteca de polipéptidos multicatenarios (o aislados pre-seleccionados de la misma) se pueden diversificar de forma adicional (por ejemplo, recombinación de cadenas polipeptídicas, redistribución o remezclamiento) para ciclos adicionales de identificación.

En una realización especialmente preferida, se proporciona un vector de presentación en fago M13 que tiene:

un sitio de clonación de cadena ligera de Ig, definido por un sitio de restricción *Apa*LI y un sitio de restricción *As*cl, y que muestra una orientación 3' hacia una secuencia señal (por ejemplo, una secuencia señal pIII), y bajo el control de transcripción de un promotor LacZ; y

un sitio de clonación de un fragmento de cadena pesada de Ig, definido por un sitio de restricción *S*fiI y un sitio de restricción *Not*I, y que tiene una orientación 3' hacia una secuencia señal (por ejemplo, una secuencia señal pIII), bajo el control de transcripción de un promotor LacZ, y en orientación 5' hacia una secuencia que codifica pIII maduro o una porción de anclaje de pIII (tocón).

El vector de presentación eucariota multicatenario en esta realización preferida es un vector de levadura que tiene:

un sitio de clonación de cadena ligera de Ig, definido por un sitio de restricción *Apa*LI y un sitio de restricción *As*cl, y que muestra una orientación 3' con respecto a una señal de secreción Aga2p y bajo el control de transcripción de un promotor GAL (preferiblemente, GAL1 o GAL1-10); y

un sitio de clonación de un fragmento de cadena pesada de Ig, definido por un sitio de restricción *S*fiI y un sitio de restricción *Not*I, y que muestra una orientación 3' con respecto a una señal de secreción Aga2p, bajo el control de transcripción de un promotor GAL (preferiblemente, GAL1 o GAL1-10), y una orientación 3' con respecto a una secuencia que codifica Aga2p madura.

El vector de expresión en levadura se usa para transformar una célula hospedadora de levadura para expresar anticuerpos o fragmentos Fab presentados en la superficie de la célula de levadura. Las secuencias codificantes de cadena ligera y pesada se escinden de forma individual (por digestión con *Apa*LI/*As*cl y digestión con *S*fiI/*Not*I, respectivamente) o conjunta (por digestión con *Apa*LI/*Not*I) a partir del vector de presentación en fagos, y se insertan en el vector de presentación en levadura multicatenario por transferencia discontinua, dando una multiplicidad de apareamientos de cadenas LC/HC para su expresión y presentación en la levadura. Un vector de presentación en levadura especialmente preferido para la presentación en levadura de Fab es pTQ3 (descrito más adelante). Una presentación en fago particularmente preferida es una extensa biblioteca de fragmentos Fab humanos (de Haard, H. et al., 1999).

El especialista en la técnica podrá apreciar que los métodos anteriores son útiles para identificar y aislar polipéptidos multicatenarios que poseen una diversidad de características detectables (por ejemplo, actividad catalítica, interacciones peptídicas, estabilidad térmica, niveles deseables de expresión), o cualquier otra mejora que sea seleccionable por medio de la expresión en superficie de un polipéptido multicatenario presentado.

Adicionalmente, se podrá ver que la presente invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo útiles para la inmunopurificación, inmunoensayos, marcaje citoquímico, y métodos de establecimiento de dianas, y métodos de diagnóstico o terapia. Por ejemplo, el anticuerpo o su fragmento se pueden unir a una proteína terapéuticamente activa tal como un interferón o un factor de coagulación sanguínea tal como, por ejemplo, Factor VIII y, por lo tanto, se puede usar para producir un medio para cromatografía de afinidad para uso en inmunopurificación o en el ensayo de la proteína.

Presentación de un polipéptido multicatenario como producto de fusión celular

El ciclo vital básico de las células eucariotas comprende la alternancia entre los estados diploide (dos copias de los cromosomas o genoma del organismo por célula) y haploide (una copia de los cromosomas o genoma del organismo por célula). La alternancia entre estos dos estados se consigue por la fusión de dos células haploides (típicamente, pero no necesariamente, la fertilización de tipos de apareamiento opuestos) para formar una única célula diploide, y división meiótica de una célula diploide para formar múltiples células haploides (hijas). Los biólogos consideran que este ciclo vital básico (es decir, la alternancia de generaciones haploides y diploides) representa un

mecanismo natural importante para la información genética de recombinación biológica (*es decir*, reproducción sexual).

En la mayoría de los animales, el estado diploide es el estadio dominante del ciclo vital, generado por la fusión de dos células haploides (normalmente denominadas gametos) de tipo de apareamiento opuesto: un espermatozoide y un óvulo. La división celular meiótica de células diploides (gametogénesis) produce el estado de célula haploide para la reproducción sexual.

El patrón del ciclo vital del reino vegetal ofrece una alternancia más general de generación, en la que los estados haploide y diploide pueden existir como generaciones más distintas, dependiendo de la especie particular de la planta. En plantas "inferiores" (*es decir*, más primitivas), predomina la generación de la célula haploide (el "gametofito") (*por ejemplo*, musgos, plantas hepáticas y hornabeque); mientras que en las plantas "superiores" (*es decir*, más evolucionadas) predomina la generación de la célula diploide (el "esporofito") (*por ejemplo*, helechos, coníferas y plantas con flor).

Para muchos hongos y protistas, predomina el estadio haploide en el ciclo vital. La fertilización produce un estadio diploide que a menudo y prácticamente de inmediato (dependiendo de las condiciones ambientales) sufre una meiosis para formar células haploides. De manera importante, e independientemente del género del organismo analizado o del estadio que domina en el ciclo vital del mismo, la recombinación natural y el re-mezclamiento de material genético resultantes de la meiosis de células diploides para producir células haploides, y la fusión celular de células haploides separadas para formar una célula diploide (con una nueva dotación genética) es un procedimiento potente que se puede utilizar en la investigación biológica. Descrito y explicado por primera vez en este documento, este potente mecanismo se utiliza en la investigación de proteínas de combinación para la generación de bibliotecas únicas de presentación de péptidos multicatenarios.

En un aspecto adicional de la presente invención, la forma de introducir vectores de presentación multicatenarios eucariotas en una célula hospedadora incluye la fusión de dos células eucariotas, preferiblemente haploides, expresando cada una de ellas al menos una de las cadenas del polipéptido multicatenario, de manera que la actividad biológica del polipéptido multicatenario se muestra en la superficie de la célula hospedadora resultante, preferiblemente diploide. Por ejemplo, cada una de las dos células haploides puede contener uno de los vectores de un conjunto de vectores (tal como se ha descrito en este documento), de modo que una vez combinadas (por ejemplo, por fusión celular de células hospedadoras) y co-expresadas en la célula hospedadora diploide resultante, se muestra la actividad biológica del polipéptido multicatenario en la superficie de la célula hospedadora. Estos métodos se pueden usar para preparar nuevas bibliotecas polipeptídicas multicatenarias como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, bibliotecas de presentación de anticuerpos o Fab, incluidas células hospedadoras diploides que muestran polipéptidos multicatenarios que poseen una mayor diversidad que el repertorio fuente).

De forma alternativa, se pueden construir poblaciones de un conjunto de vectores compatibles de modo que una población de vectores de expresión eucariotas exprese múltiples (*por ejemplo*, un repertorio o biblioteca) formas de una cadena ligera de Fab de Ig (que comprende los dominios V_L y C_L), y una segunda población de vectores de expresión eucariotas exprese múltiples formas de una cadena pesada de Fab de Ig (que comprende los dominios V_H y C_H1) fusionada con una proteína de anclaje de levadura (por ejemplo, Aga2p). Cada una de las poblaciones de vectores se utiliza para transformar células haploides de levadura de tipo de apareamiento opuesto; una construcción de vector en un tipo de apareamiento, la segunda construcción de vector en el tipo de apareamiento opuesto. Se co-cultivan las dos poblaciones de levaduras haploides en condiciones suficientes para inducir el apareamiento de levaduras (*es decir*, fusión celular) de los dos tipos de apareamiento. Las células hospedadoras de levadura diploides resultantes de la población poseen ambas construcciones de vector y expresan y muestran el Fab de Ig completamente formado y ensamblado.

Aunque, tal como se ha analizado anteriormente, se puede utilizar cualquier célula eucariota capaz de una fusión celular. La fusión celular puede tener lugar de forma sexual por apareamiento, o artificial, *por ejemplo*, en cultivos de tejido u otras condiciones artificiales. En el caso de una fusión celular sexual, resulta apropiada cualquier célula eucariota con la condición de que pueda existir (sin importar la duración) en estado tanto haploide como diploide. Para la fusión celular artificial, las células no están limitadas por la ploidía, como lo estarían en el caso de la fusión sexual. Por ejemplo, se puede inducir la fusión de células diploides de mamífero mantenidas en cultivos de tejidos, dando lugar así a células hospedadoras tetraploides. Para la presente invención, la ploidía real de las células hospedadoras que se deben fusionar no supone ninguna limitación, mientras las células se puedan fusionar. Las características importantes de las células son que un miembro celular contenga un vector o conjunto de vectores que comprenda una cadena particular de un polipéptido multicatenario y un marcador específico seleccionable, y que la célula hospedadora pareja contenga un vector o un conjunto de vectores que comprenda una segunda cadena de un polipéptido multicatenario y un marcador seleccionable. Cuando se fusionan las células, por lo tanto, la célula fusionada resultante contiene vectores que codifican dos o más cadenas de un polipéptido multicatenario en una célula que se identifica con facilidad por medio de los marcadores seleccionables.

Los hongos, y particularmente los ascomicetos (por ejemplo, *Neurospora* y levaduras), son células hospedadoras eucariotas particularmente preferidas. Los ascomicetos reciben este nombre porque producen los productos de esporas haploides de la meiosis en asci microscópicos, lo que permite su recolección, segregación, análisis y

manipulación fácilmente (se destaca particularmente *Neurospora* debido a que el tamaño y forma de su ascus conserva el orden de los productos celulares haploides de la meiosis). Igualmente, estos hongos, sobre todo *S. cerevisiae*, existen de forma estable en forma tanto haploide como diploide, en el que cualquiera de ellos se induce y conserva fácilmente (*por ejemplo*, el estado haploide de una levadura se induce y mantiene típicamente bajo alguna forma de estrés nutricional, *es decir*, carencia). Por último, en muchos hongos (también en levaduras especialmente preferidas) las células haploides existen como dos sexos (los tipos de apareamiento α y a), a partir de los cuales se fusionan sólo los tipos de apareamiento opuestos para formar el estado diploide. En condiciones manipulables en laboratorio por un especialista en la técnica, una célula α se fusionará con una célula a , creando de este modo una célula diploide fusionada.

Como se ha señalado anteriormente, en la técnica se conocen métodos artificiales para fusionar células. Adicionalmente, es posible manipular protoplastos o esferoplastos de levadura para producir la fusión celular incluso si son del mismo tipo de apareamiento. Estos métodos artificiales de fusión celular son conocidos en la técnica y resultan apropiados a los efectos de la presente invención.

Por último, los especialistas con experiencia en la técnica reconocerán y apreciarán que los productos y métodos descritos y demostrados en este documento no están limitados por una célula hospedadora eucariota de una ploidía particular. De hecho, se pueden utilizar otros organismos poliploides (*por ejemplo*, formas triploides y tetraploides más extrañas) sobre todo como hospedadores para conjuntos de vectores que expresan polipéptidos multicatenarios de orden superior (*por ejemplo*, de tres y cuatro cadenas, respectivamente).

Identificación de polipéptidos multicatenarios usando una fusión celular eucariota

Las bibliotecas de polipéptidos multicatenarios presentadas en células hospedadoras eucariotas se pueden identificar y manipular por procedimientos y métodos similares conocidos en la técnica, *por ejemplo*, identificación de biblioteca de presentación en fago, pero permiten también al especialista beneficiarse de las condiciones de cultivo y calidades de expresión de un sistema hospedador eucariota. Como se ha señalado anteriormente, la identificación de presentación eucariota se puede prologar con un ciclo inicial de identificación de presentación en fagos antes de transferir la biblioteca de presentación desde el vector de presentación en fagos a un vector de presentación eucariota multicatenario. Una vez insertada en el vector de presentación eucariota multicatenario, la biblioteca de polipéptidos multicatenarios (o aislados preseleccionados) se puede someter a uno o múltiples ciclos de identificación bajo el sistema de presentación eucariota.

Como una realización adicional de los métodos de identificación de la presente invención, y de manera exclusiva para los métodos de la presente invención, las bibliotecas de presentación eucariotas multicatenarias se pueden someter a una diversificación adicional (parcial u objetiva) subsiguiente a cualquier ensayo de identificación que utilice la alternancia de generaciones característica de los sistemas eucariotas, tal como se ha analizado anteriormente. En poblaciones de células hospedadoras eucariotas diploides, que contienen un vector de presentación multicatenario, en las que diferentes cadenas de la multicadena se expresan a partir de diferentes vectores (*por ejemplo*, cuando la célula hospedadora diploide es el producto del apareamiento de haploides o de la fusión celular, como se ha descrito anteriormente), es posible inducir su sometimiento a una meiosis (*por ejemplo*, esporulación en levaduras). Las células haploides de levadura (esporas) se pueden segregar y/o seleccionar dependiendo de las condiciones de identificación, con el fin de aislar diferentes vectores de expresión eucariotas con una propiedad preferida de interés en células hijas haploides distintas. A continuación, las células hijas pueden ser opcionalmente:

sometidas a mutagénesis (variegación) *in vitro* (*por ejemplo*, manipulación de ADN aislado) o *in vivo* (*por ejemplo*, luz UV) para proporcionar una multiplicidad de homólogos de las cadenas preseleccionadas. Cuando se coexpresan y presentan estas cadenas homólogas, es posible seleccionar polipéptidos multicatenarios homólogos que muestran mayores afinidades por la misma molécula diana; o

fusionadas nuevamente con otras células hospedadoras hijas, recombinando de este modo cadenas preseleccionadas individuales de los aislados de polipéptidos multicatenarios entre sí; o

fusionadas con la población de células hospedadoras de la biblioteca multicatenaria inicial, recombinando de esta forma cadenas preseleccionadas de los aislados de polipéptidos multicatenarios con la fuente original de la variante multicatenaria; o

fusionadas con una nueva población de células hospedadoras de biblioteca multicatenaria; combinando de este modo las cadenas preseleccionadas de los aislados de polipéptidos multicatenarios con una nueva fuente de variabilidad multicatenaria; o

cualquier combinación de cualquiera de las etapas anteriores, según sea apropiado.

Una vez completada esta recombinación, re-distribución o re-mezclamiento de cadenas preseleccionadas de una identificación de polipéptidos multicatenarios entre sí o con otra fuente de diversidad multicatenarioa la nueva población de la biblioteca de mezcla se puede someter a ciclos adicionales de identificación nueva o repetida.

La presente invención hace referencia a técnicas descritas en las siguientes publicaciones:

- Ausubel, F. *et al.*, eds., Short Protocols In Molecular Biology (4^a Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY, NY. (ISBN 0-471-32938-X).
- 5 Fink y Guthrie, eds., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (1991) Academic Press, Boston, MA. (ISBN 0-12-182095-5).
- Kay *et al.*, Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (1996) Academic Press, San Diego, CA.
- Kabat, E. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (5^a Ed. 1991) U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD.
- 10 Lu y Weiner, eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysts (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. (ISBN 1-881299-21-X).
- Old, R. y Primrose, S., Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3^a Ed. 1985). Blackwell Scientific Publications, Boston, MA. Studies in Microbiology; V.2:409 (ISBN 0-632-01318-4).
- Sambrook, J. *et al.*, eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, NY. Vol. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6).
- 15 Winnacker, E., From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY, NY (traducido por Horst Ibelgaufts). (ISBN 0-89573-614-4).

Referencias

- Boder, E. y Wittrup, K. 1998. Biotechnol. Prog., 14:55-62.
- Chang, H. *et al.*, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11408-12.
- 20 Crameri, R. y Blaser, K., 1996. Int. Arch. Allergy Immunol., 110:41-45.
- Crameri, R. y Suter, M., 1993. Gene, 137:69-75.
- de Haard, H. *et al.*, 1999. J. Biol. Chem, 274:18218-18230.
- Fields, S. y Sternglanz, R., 1994, Trends Genet, 10:286-292.
- Gietz, D. *et al.*, 1992. Nucleic Acids Res., 20:1425.
- 25 Hoogenboom, H. *et al.*, 1997: Trends Biotechnol., 15:62-70.
- Horwitz, A. *et al.*, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8678-8682.
- Kieke, M. *et al.*, 1997. Protein Eng, 10:1303-1310.
- Kieke, M. *et al.*, 1999. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:5651-5656.
- Ladner, R. *et al.*, 1993, patente U.S. nº 5,223,409.
- 30 Liu, Q. *et al.*, 2000. Methods Enzymol, 328:530-549.
- Moll, J. *et al.*, 2001. Protein Sci, 10:649-55.
- Munro, S. y Pelham, H., 1987. Cell, 48:899.
- Phizicky, E. y Fields, S., 1995. Microbiol. Rev, 59:94-123.
- Pu, W. y Struhl, K., 1993. Nucleic Acids Res, 21:4348-55.
- 35 Walhout, A. *et al.*, 2000. Methods Enzymol., 328:575-593.
- Wittrup *et al.*, documento WO 99/36569.

Esta invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, que no deben ser considerados limitantes de ninguna manera.

EJEMPLOS

- 40 **EJEMPLO 1 Construcción de un vector de presentación eucariota multicatenario; pTQ3**

Los materiales y técnicas descritos anteriormente se utilizaron para construir un vector de presentación eucariota multicatenario; específicamente, un vector de presentación en levadura eficaz en una célula hospedadora de levadura transformada con el vector. El vector es útil para expresar, transportar, ensamblar y presentar un polipéptido multicatenario biológicamente activo (por ejemplo, un Fab de Ig) en la superficie de una célula hospedadora de levadura.

En este ejemplo, se utilizó un vector disponible en el mercado, pYD1 (InVitrogen, Carlsbad, CA), un vector de expresión de 5,0 kb diseñado para la expresión, secreción y presentación de una proteína monocatenaria en la superficie de células de *S. cerevisiae*, como plantilla del vector de expresión eucariota de partida. pYD1 incluye: un gen *aga2* que codifica una de las subunidades del receptor de α -aglutinina; un promotor *GAL1* para la expresión regulada de una fusión de Aga2/polipéptido; un marcador de epítipo HA para la detección de la proteína presentada; un marcador de poli-histidina (6xHis) para la purificación sobre resina quelante de metal; un CEN6/ARS4 para la replicación episomal estable en levadura; y un gen *Trp1* para la selección de transformantes de *S. cerevisiae*, un gen de resistencia a ampicilina (*ampR*) y el origen pMB1 para la selección y replicación en *E. coli*.

El plásmido pYD1 se modificó para la expresión de una cadena ligera de Ig y un fragmento de una cadena pesada a partir de dos promotores en tándem inducibles por galactosa, para la presentación de un fragmento de anticuerpo Fab intacto. Un promotor *GAL1* dirige la expresión de la cadena ligera y el otro promotor *GAL1* dirige la expresión del fragmento de cadena pesada fusionado con el extremo C-terminal de la proteína de anclaje de levadura Aga2p.

Al objeto de transferir efectivamente las cadenas de un polipéptido multicatenario al vector de presentación, se generaron sitios de restricción únicos como parte de la construcción de vector. Las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción (es decir, sitios de restricción) seleccionadas para esta construcción de vector incluyeron *Apa*LI, *As*cl, *S*fiI y *Not*I como sitios de clonación únicos para las cadenas de un polipéptido bicatenario (en este caso, un Fab de Ig), y *N*heI para facilitar las transferencias de presentación en fago-presentación eucariota con las bibliotecas de presentación en fago existentes.

Se llevaron a cabo varias modificaciones de la secuencia del vector para asegurar el uso eficaz de *Apa*LI con un único sitio de restricción. Los sitios *Apa*LI situados en el plásmido pYD1 (como lo suministra InVitrogen), que parten de las posiciones 1393, 3047 y 4293, se eliminaron por mutagénesis dirigida (usando QUICKCHANGE, Stratagene, La Jolla, California) como se indica a continuación:

posición de pYD1	cambio de nucleótido <i>Apa</i> LI
1393	GTGCAC a GTGCAG
3047	GTGCAC a GTGCTC
4293	GTGCAC a GAGCAC

El sitio *Apa*LI que se comienza en la posición 3047 se encuentra dentro del *ampR*, y requiere una mutación silenciosa para no modificar la secuencia codificante de aminoácidos de este gen.

Con el fin de hacer que la construcción de vector de presentación en levadura multicatenario sea compatible con otros vectores de presentación en fago preexistentes en la técnica (Dyax Corp., Cambridge, MA), se introdujo un único sitio de restricción en la secuencia señal *aga2p* del vector pYDI sin alterar la secuencia codificante, usando técnicas de mutagénesis por PCR dirigida al sitio, conocidas en la técnica. Específicamente, se creó un sitio *N*heI a través del codón de serina terminal de la secuencia señal *aga2p* mediante la sustitución del codón TCA con un codón AGC.

El vector modificado de este modo, que tiene un sitio *Apa*LI único en posición 3' inmediatamente adyacente a los segmentos de promotor *GAL1*-secuencia señal *aga2p*-marcador HA preexistentes, seguido de un sitio *As*cl y un sitio *N*heI incorporado en la secuencia señal *aga2p*, se denominó pTQ2.

Se utilizaron procedimientos de ensamblaje por PCR conocidos en la técnica para construir un poli-ligador compatible con las bibliotecas de presentación en fago existentes para la escisión/inserción de genes estructurales para el componente de cadena ligera de un Fab en el vector de presentación en levadura multicatenario. El segmento del vector de presentación eucariota multicatenario intermedio resultante, que se extiende desde la secuencia señal *aga2p* a través del sitio de poli-ligador diseñado es como se indica a continuación (* indica codones de parada):

NheI

ATG CAG TTA CTT CGC TGT TTT TCA ATA TTT TCT GTT ATT GCT AGC GTT

M O L L R C F S I F S V I A S V

Secuencia señal de Aga2p

ApaLI

TTA GCA TAC CCA TAC GAC GTT CCA GAC TAC GCT AGT GCA CAG GAT

L A Y P Y D V P D Y A S A Q D

marcador de epitopo de HA

AscI

BamHI

PstI

TTC GTG CAA TGC GGC GCG CCA GGA TCC GCC TGA ATG GTC TGC AGA

F V Q C G A P G S A * M V C R

EcoRI

PacI

CCG TAC CGA CCG AAT TCG AGT TAC CTG AGG TTA ATT AAC ACT GTT

P Y R P N S S Y L R L I N T V

PmeI

ATC GTT TAA ACG TTC AGG TGC AA (SEC ID n° 1)

I V * T F R C (SEC ID n° 2)

5 Se amplificó por PCR una secuencia de terminación de la transcripción MAT α a partir del plásmido pYDI, y se incorporaron sitios de restricción *BamHI* y *PstI* para facilitar la clonación en el plásmido pTQ2 anterior. Seguidamente, el terminador MAT α se digirió con *BamHI* y *PstI*, y se insertó en el sitio *BamHI/PstI* en el plásmido pTQ2.

10 A partir del plásmido pYDI se amplificó una construcción de ADN que incluyó (5'-3'); el promotor *GAL1*, la secuencia señal *aga2p*, la secuencia codificante de la proteína Aga2p y un ligador de glicina/serina. Se agregaron un segmento ligador de ADN que contuvo los sitios de restricción *SfiI* y *NotI* y un segmento que codificó un marcador myc en el extremo 3' del segmento pYDI amplificado. El marcador myc se incluyó para permitir la detección de la cadena anclada (del polipéptido multicatenario) en la superficie de la célula de levadura. Las secuencias del segmento de enlazador-myc son las siguientes:

GGA GGC GGA GGT TCT GGG GGC GGA GGA TCT GGT GGC GGA GGT TCT
 G G G G S G G G G S G G G G S

*Sfi*I

*Not*I

GCG GCC CAG CCG GCC AGT CCT GAT GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC
 G G Q P G S P D A A A E Q K L

*Pac*I

ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT TTA ATTAA (SEC ID n° 3)

I S E E D L N (SEC ID n° 4)

Este segmento de ligador-myc se insertó en un pTQ2 digerido con *Eco*RI y *Pac*I. El plásmido resultante, con sitios de clonación únicos para la inserción/escisión de las cadenas de un polipéptido multicatenario (específicamente, cadena ligera y fragmentos de la cadena pesada de un Fab), se designó pTQ3 (Fig. 3). El plásmido pTQ3 es un plásmido de presentación en levadura multicatenario de 5810 pb que comprende, en parte pertinente, la siguiente secuencia de vector:

5

←-----secuencia de señal de Aga2p-----→

435 ATG CAG TTA CTT CGC TGT TTT TCA ATA TTT TCT GTT ATT GCT
 M Q L L R C F S I F S V I A

-----> <-----marcador de HA----->

AGC GTT TTA GCA TAC CCA TAC GAC GTT CCA GAC TAC GCT
 S V L A Y P Y D V P D Y A

*Apa*LI

*Asc*I

*Bam*HI

AGT GCA CAG GAT TTC GTG CAA TGC GGC GCG CCA GGA TCC
 S A Q D F V Q C G A P G S

ATG TAA

M

(SEC ID N°: 6)

<----- terminador Mat α ----->

661 CAAAATCGACTTTGTTCCCACTGTACTTTAGCTCGTACAAAATACAATATACTTTTCAT
 721 TTCTCCGTAAACAACATGTTTTCCCAATGTAATATCCTTTTCTATTTTCGTTCCGTTACC
 781 AACTTTACACATACTTTATATAGCTATTCACCTCTATACTAATAAACTAAGACAATTT
 841 TAAATTTGCTGCCCTGCCATATTTCAATTTGTTATAAATTCTATAATTTATCTATTAGT

EcoRI

901 AGCTAAAAAAGATGAATGTGAATCGAATCCTAAGAGAATTCACGGATTAGAAGCCGCCG

<----- promotor de GAL1 ----->

961 AGCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCTCGTCTCACCGGTCG
 1021 CGTTCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAA
 1081 TACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAACCTTC
 1141 AAATGAACGAATCAAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTAT
 1201 TTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTGTATCTATTAACAGATATATAAATGC
 1261 AAAAACTGCATTAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTT
 1321 ATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTC
 1381 AAGGAGAAAAAACC CGGATCGGACTACTAGCAGCTGTAATACGACTCACTATAGGGAATA
 1441 TTAAGCTAATCTACTTCATACATTTTCAATTAAG

<----- secuencia de señal de Aga2p ----->

1476 ATG CAG TTA CTT CGC TGT TTT TCA ATA TTT TCT GTT ATT GCT TCA GTT TTA GCA

```

M Q L L R C F S I F S V I A S V L A
-----> <----- proteína de Aga2 madura -----
1530 CAG GAA CTG ACA ACT ATA TGC GAG CAA ATC CCC TCA CCA ACT TTA GAA TCG ACG
      Q E L T T I C E Q I P S P T L E S T
-----
1584 CCG TAC TCT TTG TCA ACG ACT ACT ATT TTG GCC AAC GGG AAG GCA ATG CAA GGA
      P Y S L S T T T I L A N G K A M Q G
-----
1638 GTT TTT GAA TAT TAC AAA TCA GTA ACG TTT GTC AGT AAT TGC GGT TCT CAC CCC
      V F E Y Y K S V T F V S N C G S H P
-----
1692 TCA ACG ACT AGC AAA GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT GTT TTT
      S T T S K G S P I N T Q Y V F
-----
<----- enlazador Glicina-Serina ----->
1736 GGA GGC GGA GGT TCT GGG GGC GGA GGA TCT GGT GGC GGA GGT TCT
      G G G G S G G G G S G G G G S
-----
                SfiI                NotI    <----- marcador myc -----
1782 GCG GCC CAG CCG GCC AGT CCT GAT GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA
      A A Q P A S P D A A A E Q K L I S E
-----
----->    PacI                PmeI
1836 GAG GAT CTG AAT TTA ATT AAC ACT GTT ATC GTT TAAAC (SEC ID Nº: 5)
      E D L N L I N T V I V (SEC ID Nº: 7)

```

Se llevaron a cabo modificaciones posteriores del vector anterior insertando un marcador 6xHis para la purificación de anticuerpos Fab solubles y mediante la recolocación del codón de parada (TAA) en el extremo del marcador myc, antes del sitio *PacI*, para eliminar aminoácidos superfluos. Otras modificaciones han incluido la eliminación de un sitio de restricción *XbaI* endógeno dentro del marcador selectivo *Trp* por mutagénesis dirigida. Esto se realizó para facilitar la clonación y la manipulación de los anticuerpos principales del conjunto de bibliotecas CJ (Dyax Corporation, Cambridge, MA).

EJEMPLO 2: Transferencia de presentación en fago-eucariota y expresión en células hospedadoras eucariotas de polipéptidos Fab multcatenarios, específicos para estreptavidina, mucina-1 y antígeno 4 asociado a linfocito-T citotóxico

Se transfirieron diferentes Fab de presentación en fago desde el vector de presentación en fago hasta un vector de presentación eucariota multcatenario para demostrar la utilidad del sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota, y la capacidad del vector eucariota multcatenario de la presente invención para expresar un polipéptido multcatenario. A continuación, el vector se insertó en una célula hospedadora eucariota, y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para la expresión de los Fab.

Se clonaron cada uno de anticuerpos Fab anti-estreptavidina, F2, A12 y 4C8 a partir de una extensa biblioteca de Fab humanos sin tratamiento previo (de Haard, H. et al., 1999) en el vector de presentación en levadura multcatenario pTQ3 construido en el Ejemplo 1, en forma de una cadena ligera ($V_L C_L$) y cadena pesada ($V_H C_H1$) apareadas. Adicionalmente, se clonó un anticuerpo Fab anti-mucina, PH1, a partir de la misma biblioteca de Fab en el vector de presentación en levadura multcatenario pTQ3, construido en el Ejemplo 1, en forma de una cadena ligera ($V_L C_L$) y cadena pesada ($V_H C_H1$) apareadas. Adicionalmente, se clonaron cuatro anticuerpos, E7, E8, A9, A11, específicos para el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) a partir de la misma biblioteca de Fab en el

vector de presentación en levadura multicatenario pTQ3 construido en el Ejemplo 1, en forma de una cadena ligera (V_{LC}) y cadena pesada (V_{HC}) apareadas.

Las cadenas de los Fab se clonaron en el vector de presentación en levadura multicatenario usando el procedimiento de transferencia de escisión/inserción único que se ha descrito anteriormente y se ilustra en la Fig. 1. El polinucleótido LC-HC de la biblioteca de Fab se insertó como un único fragmento *Apa*I/*Not*I. Los elementos de control genéticos procariotas no deseados que intervinieron en las regiones codificantes del fragmento LC y HC, y definidos por el fragmento de restricción *Ascl*/*Sfi*I de la biblioteca Fab se sustituyó con el fragmento *Ascl*/*Sfi*I derivado de pTQ3.

Los plásmidos resultantes, denominados pTQ3-F2, pTQ3-A12, pTQ3-4C8, pTQ3-PH1, pTQ3-E7, pTQ3-E8, pTQ3-A9 y pTQ3-A11, se transformaron por separado en una cepa de *S. cerevisiae* EBY100 (Invitrogen, Carlsbad, CA), según el método de Gietz, D. et al., 1992. También se transformó EBY100 con pTQ3 que no contuvo ningún inserto multicatenario a modo de control. La selección de transformantes se llevó a cabo seleccionando un marcador auxótrofo de triptófano para el vector (medio definido sintético menos triptófano, glucosa al 2% (peso/volumen), agar al 2% (SDCAA+GA)).

Los transformantes exitosos (denominados de manera correspondiente "EBY100 pTQ3-F2", "EBY100 pTQ3-A12", "EBY100 pTQ3-4C8", "EBY100 pTQ3-PH1", "EBY100 pTQ3-E7", "EBY100 pTQ3-E8", "EBY100 pTQ3-A9", "EBY100 pTQ3-A11" y el control "EBY100 pTQ3") se cultivaron durante una noche a 30°C con agitación en 10 ml de SDCAA+G. Se extrajeron de inmediato dos muestras de células cuando la DO_{600} alcanzó 1,0 (por ejemplo, 2 ml de un cultivo de DO_{600} de 1,0) para la preparación del lisado de proteína en el punto de inducción de tiempo igual a cero (T_0). Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron y las células de levadura aglomeradas se suspendieron nuevamente en 10 ml de SDCAA, 2% (peso/volumen) de galactosa hasta una DO_{600} de 1. Las células se hicieron crecer a 20°C para inducir la expresión del vector de las cadenas ligera y pesada durante 48 horas. Seguidamente, las células cultivadas se centrifugaron y lavaron dos veces en 1 ml de agua esterilizada, transfiriéndolas a un tubo de Eppendorf para centrifugación.

Los sedimentos celulares se suspendieron nuevamente en 250 ml de tampón SDS-PAGE más ditiotreitól (DTT); se agregaron perlas de vidrio de 425-600 micrómetros (Sigma, St. Louis, MO) hasta inmediatamente por debajo del menisco, y la suspensión se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto. La suspensión se mantuvo sobre hielo entre los procedimientos de vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se calentó a 100°C durante 5 minutos.

Se separaron muestras de proteína en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia de Western. La detección del polipéptido de cadena ligera se llevó a cabo usando un anticuerpo anti-HA (1 µg/ml) (Dako, Carpintería, CA). La detección del polipéptido de fusión de cadena pesada-Aga2p se efectuó usando un anticuerpo anti-c-Myc (1 µg/ml) junto con un anticuerpo HRP anti-ratón de conejo secundario (Dako, Carpintería, CA). La inmunodetección se potenció por quimioluminiscencia (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Se detectaron el producto LC de aproximadamente 30 kD y el producto de fusión de HC-Aga2p de aproximadamente 45 kD de los Fab expresados (F2 y PH1; Figs. 4A y 4B). Antes de la inducción con galactosa (véanse las Figs. 4A y 4B) se detectó el producto LC o de la fusión de HC-Aga2p no detectable.

EJEMPLO 3: Presentación funcional en superficie de un polipéptido multicatenario en una célula hospedadora eucariota

Como demostración de la capacidad del vector eucariota multicatenario para expresar, ensamblar y presentar adecuadamente un polipéptido multicatenario biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota, se insertó un vector de presentación eucariota multicatenario en una célula hospedadora eucariota y se cultivó la célula hospedadora transformada en condiciones apropiadas para la expresión y presentación del Fab en la superficie de la célula hospedadora.

Se prepararon los clones de levadura EBY100 pTQ3-F2, EBY100 pTQ3-PH1, EBY100 pTQ3-E7, EBY100 pTQ3-E8, EBY100 pTQ3-A9 y EBY100 pTQ3-A11, se cultivaron y se indujo la expresión de anticuerpos, de la forma descrita en el Ejemplo 2 anterior. Se extrajeron tres alícuotas de 0,2 ml de células de levadura con una DO_{600} de 1,0 antes de la inducción con galactosa, como punto T_0 .

Después de inducir la expresión con galactosa (Ejemplo 2), se extrajeron otras tres alícuotas adicionales de 0,2 ml, con una DO_{600} de 1,0. Las muestras de levadura se centrifugaron y el sedimento de células se suspendió nuevamente en PBS que contuvo 1 mg/ml de BSA.

Se centrifugaron nuevamente dos muestras y se suspendieron otra vez los sedimentos de células en 100 ml de anticuerpo anti-c-Myc (2,5 µg por muestra), o 100 ml de anticuerpo anti-HA (2,0 µg por muestra). A continuación, las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, se sedimentaron las células y se lavaron una vez con 0,5 ml de PBS/BSA. A continuación, las muestras se incubaron con anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado con FITC (dilución 1:40) durante 1 hora en la oscuridad.

Las muestras celulares se marcaron con estreptavidina-FITC (dilución 1:20) en PBS/BSA al 1% (peso/volumen) y se incubaron durante una noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Todas las muestras se centrifugaron y los

sedimentos celulares se lavaron una vez con 0,5 ml de PBS y luego se suspendieron nuevamente en 500 ml de PBS.

La presencia de unión de Fab unido a la superficie celular-antígeno se detectó por citometría de flujo. Las células antes de la inducción no mostraron presentación alguna de cadena ligera, cadena pesada o anticuerpo Fab que se une a estreptavidina funcional. Tras la inducción de la expresión de Fab, fue posible detectar células de levadura que presentan LC, HC, y también anticuerpo Fab que se une a estreptavidina funcional por inmunofluorescencia (Fig. 4C), por FACS (Fig. 5A-C) y ELISA de células enteras de levadura (Fig. 6, véase el Ejemplo 7). También se pudo demostrar la presentación funcional de los anticuerpos Fab anti-CTLA-4 (datos no mostrados).

En el caso de EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pTQ3-PH1, la unión a antígeno como se detecta por FACS se pudo completar con antígeno soluble no marcado. La unión competitiva mostró la absoluta especificidad del anticuerpo Fab ensamblado de forma combinatoria, presentado en la superficie de la célula de levadura (Figura 5C).

EJEMPLO 4: Enriquecimiento Preferencial de Células de Levadura que Presentan Fab: Detección por Selección con Perlas Magnéticas

Para demostrar que las células de levadura que presentan un anticuerpo Fab específico para el antígeno pueden ser enriquecidas con respecto a un exceso de células de levadura irrelevantes, se llevaron a cabo experimentos para la selección de modelo usando un dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas.

La célula de levadura que presenta Fab EBY100 pTQ3-F2 (con un marcador seleccionable auxótrofo de triptófano) se mezcló con células de levadura inespecíficas a diferentes relaciones. Las células de levadura inespecíficas consistieron en EBY100 pUR3867 (Unilever Research, Vlaardingen, Países Bajos), que codifican un anticuerpo scFv específico para mucina-1 (PH1), y son portadoras de un marcador seleccionable auxótrofo de leucina. La relación de células *Leu⁺/Trp⁺* antes y después de la selección se utilizó para calcular el factor de enriquecimiento después de 1 ciclo de selección.

Se cultivaron clones de levadura y se indujo la expresión de anticuerpos con galactosa, como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los dos clones de levadura se mezclaron en la relación indicada anteriormente, y se incubaron durante 1 hora con 100 µl de perlas paramagnéticas de estreptavidina (Dynal M280, Dynal Biotech, Oslo, Noruega) en un volumen final de 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato al 2% (por ejemplo, 2% de MARVEL-PBS o "MPBS", Premier Brands Ltd., Reino Unido).

Después de la incubación de la mezcla de levadura-perlas, se lavaron los complejos célula-perlas durante 11 ciclos en MPBS al 2%, mediante la transferencia de los complejos de un pocillo al siguiente pocillo en un dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas. Después del lavado con MPBS al 2%, se llevaron a cabo otras dos etapas de lavado con PBS. En el último pocillo del dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas, los complejos de célula-perlas se suspendieron nuevamente en 1 ml de PBS y se determinaron los títulos mediante la siembra en placas de agar SDCAA+G o con un medio sintético definido que contuvo glucosa al 2% (peso/volumen) que contuvo medio de desecho de leucina más 2% de agar (placas de agar SD-Leu+G). Para la selección por la clasificación de células magnéticas activadas (MACS), las células de levadura se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con 500 µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en 6 ml de PBS+EDTA 2 mM. La mezcla de células/perlas se cargó en una columna LS lavada previamente (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en presencia de un imán, y la columna se lavó dos veces con PBS+EDTA 2 mM. Después de retirar el imán, las células de levadura fijadas se eluyeron con 6 ml de tampón PBS.

Para las selecciones de levadura usando el dispositivo de lavado capilar (CWD), la mezcla de células de levadura y 100 µl de perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal M280) se bloqueó en 1 ml de MPBS al 2% durante 1 hora. Las perlas paramagnéticas se suspendieron nuevamente en 1 ml de suspensión de células de levadura y se hicieron girar suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente en un tubo de Eppendorf. Tras la incubación de las células de levadura con las perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, la mezcla se introdujo en el capilar (se usó 1 ml para cargar un capilar en 5 etapas de 200 µl) del CWD. Después del lavado automatizado y la nueva suspensión de la mezcla de células-perlas, se llevó a cabo un lavado final con PBS y se recogió el complejo de levadura/perlas mediante el ajuste del imán.

El uso de dos marcadores seleccionables permitió discriminar la levadura específica (capaz de crecer en placas de agar selectivo, sin triptófano) de las células de levadura inespecíficas (que son capaces de crecer en placas de agar selectivas sin leucina). Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada título.

El factor de enriquecimiento se calculó como la relación de células de levadura específicas antes y después de la selección, dividido entre la relación de la levadura inespecífica antes y después de la selección.

Tabla 1: Modelo de enriquecimiento de células de levadura que presentan Fab: Detección por selección con perlas magnéticas

<i>Kingfisher</i>			
Relación ^a	Células totales ^b	Enriquecimiento ^c	Recuperación (%) ^d
1/100	~10 ⁷	288.000	12,8
1/1000	~10 ⁸	1.100.000	6
1/10000	~10 ⁹	400.000	10,7
<i>Dispositivo de Lavado Capilar (CWD)</i>			
Relación	Células totales	Enriquecimiento	Recuperación (%)
1/100	~10 ⁷	76.000	4,7
1/1000	~10 ⁸	41.000	6
1/10000	~10 ⁹	10.000	5,3
<i>MACS</i>			
Relación	Células totales	Enriquecimiento	Recuperación (%)
1/1000	10 ⁷	100	12

a. relación de células positivas, EBY100 pTQ3-F2, a células de levadura negativas, EBY100 pUR3867-PH1

b. número total de células de levadura seleccionadas

c. factor de enriquecimiento como la relación del número de células positivas a células negativas antes y después de la selección

d. porcentaje de células de entrada positivas retenidas tras la selección.

5 Como se muestra en la Tabla 1, las células de levadura específicas que presentan un anticuerpo Fab contra estreptavidina se pueden enriquecer en un orden de magnitud entre 2 y 6 con respecto a las células de levadura irrelevantes por medio de un ciclo de selección en un dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas tal como Kingfisher, un dispositivo de lavado capilar o por clasificación magnética de células activadas (MACS).

EJEMPLO 5: Enriquecimiento Preferencial de Células de Levadura que Presentan Fab: Detección por Citometría de Flujo

10 Como una alternativa al método de elección de perlas magnéticas del Ejemplo 4 anterior, se demostró el enriquecimiento en un anticuerpo Fab específico para un antígeno con respecto a un exceso de células de levadura irrelevantes, usando técnicas de clasificación celular activadas por fluorescencia (FACS).

15 Las células de levadura que presentan Fab, EBY100 pTQ3-F2 (con un marcador seleccionable auxótrofo de triptófano) se mezclaron con las células de levadura inespecíficas, EBY100 (pUR3867-PH1) portadoras de un marcador auxótrofo de Leu, en relaciones de 1:100, 1:1000 y 1:10.000. La mezcla de células de levadura se incubó con estreptavidina-FITC 1 μM (Dako, Carpintería, CA) y se permitió que se equilibrara durante 30 minutos a temperatura ambiente.

20 Se clasificaron tres mil células por citometría de flujo, y se recolectó 6,5% de células con la señal de fluorescencia más alta. Las células de levadura antes y después de la selección se sembraron en placa sobre placas de agar SDCAA+G y placas de agar SD-Leu+G, y se determinó el número de UFC. El factor de enriquecimiento se calculó como la relación de la relación resultante dividida entre la relación inicial de EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pUR3867-PH1.

Después de un ciclo de FACS, EBY100 pTQ3-F2 se enriqueció con respecto a EBY100 pUR3867-PH1 diez veces (datos no mostrados).

Tabla 2: Factores de enriquecimiento determinados usando FACS

<i>Pureza inicial^a (%)</i>	<i>Pureza clasificada^b (%)</i>	<i>Factor de enriquecimiento^c</i>
1,6	85	52
0,79	29	36
0,02	5,2	212

a. porcentaje de células positivas (EBY100 pTQ3-F2) frente a células negativas (EBY100 pUR3867-PH1) antes de la selección

b. porcentaje de células positivas (EBY100 pTQ3-F2) frente a células negativas (EBY100 pUR3867-PH1) después de la selección

c. relación de pureza inicial frente a pureza clasificada

EJEMPLO 6: Transferencia discontinua de una biblioteca de anticuerpos de presentación en fago a un vector de presentación eucariota multicatenario

- 5 Como demostración de la utilidad del sistema de transferencia de presentación en fago/presentación eucariota para transferir una biblioteca de péptidos de presentación en fago de forma masiva a un vector de presentación eucariota multicatenario de la presente invención, se transfirió una biblioteca de Fab de presentación en fago, utilizando métodos conocidos en la técnica, al vector de presentación en levadura multicatenario pTQ3 producido como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.
- 10 Para transferir el repertorio de presentación en fagos al vector de presentación en levadura multicatenario, se utilizó el procedimiento de transferencia de escisión/inserción única descrito anteriormente e ilustrado en la Fig. 1 (véase también el Ejemplo 1).
- 15 Se inoculó un cultivo de 50 ml de TYAG (TY, ampicilina 100 µg/ml, glucosa al 2%) con 10 µl de un lote madre de glicerol de un ciclo de selección en estreptavidina de una biblioteca de Fab no tratada previamente clonada en un fago (de Haard, H. et al., 1999). El cultivo se llevó a cabo durante una noche a 37°C y se preparó ADN plasmídico (sistema de purificación de plásmido QIAGEN, Qiagen, Valencia, CA).
- 20 El repertorio de anticuerpo Fab se digirió con *Apa*I y *Not*I y se recuperaron fragmentos de anticuerpo Fab de aproximadamente 1,5 kb, y se purificaron por extracción de un gel de agarosa y bromuro de etidio TBE al 1,0% (kit de extracción en gel QIAEX, Qiagen, Valencia, CA).
- 25 De forma similar, el vector de presentación en levadura multicatenario pTQ3 se digirió con *Apa*I y *Not*I y se purificó un fragmento de aproximadamente 4,6 kb por extracción en un gel de agarosa y bromuro de etidio TBE al 1,0%.
- La ligadura de los insertos de anticuerpo Fab recuperados de la biblioteca de Fab en el plásmido pTQ3 digerido con *Apa*I y *Not*I se llevó a cabo en una relación de 4:1 (inserto-vector) usando 1 µg de fragmentos Fab y 0,7 µg de vector pTQ3 en 100 µl de reacción durante una noche a 16°C. La mezcla de ligadura se purificó con extracciones en fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (PCI) y posteriormente se precipitó con etanol al 100%.
- 30 La mezcla de ligadura purificada se transformó en la cepa TG1 de *E. coli* (Netherlands Culture Collection of Bacteria, PC 4028, Utrecht, NL) por electroporación usando un Pulsador BioRad (BioRad, CA) a 2,5 kV, 25 mF y 200 W. La biblioteca se sembró en placa sobre placas de agar 2x TY (16 g/l de bacto-triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de bacto-agar) que contuvo 100 µg/ml de ampicilina y 2% en peso/volumen de glucosa (placas TYAG). Después del crecimiento durante una noche a 37°C, el repertorio se recuperó en 2x medio TY más ampicilina a 100 µg/ml mediante la inundación de las placas y congelación en alícuotas en glicerol al 15% (peso/volumen).
- 35 La biblioteca contuvo 5,6 x 10⁶ clones independientes. Se usaron 15 µl de una suspensión de biblioteca de 5,4 x 10¹⁰ células/ml para inocular 100 ml de TYAG, y el cultivo se llevó a cabo durante una noche a 37°C. Se recuperó el ADN plasmídico de la forma descrita anteriormente.
- El repertorio pTQ3-fab intermedio se sometió entonces a digestión con *As*cI y con *S*fI. Se purificó un fragmento de aproximadamente 6,1 kb de la forma descrita más arriba. El vector fuente pTQ3 se digirió de manera similar con *As*cI y *S*fI, y se purificó un fragmento de aproximadamente 1150 pb.
- 40 Dicho fragmento purificado de 1150 pb se ligó con el repertorio pTQ3-Fab digerido con *As*cI y *S*fI en una relación de 6:1 (inserto-vector), usando 1,6 µg de inserto y 1 µg de vector. La mezcla de ligadura se purificó y transformó en la

cepa TG1 de *E. coli*, como se ha descrito anteriormente, para dar una biblioteca final pTQ3-Fab de 1×10^6 clones independientes.

La biblioteca se recuperó de las placas del modo descrito más arriba, y se inocularon 10 ml en 50 ml de TYAG y se cultivó durante una noche a 37°C. Se preparó ADN plasmídico a partir de la biblioteca pTQ3-Fab y se transformó en la cepa de levadura EBY100 por el método de Gietz, D. et al. (1992) para dar un tamaño de biblioteca final en levadura de 2×10^6 clones de levadura independientes.

EJEMPLO 7: Selección de una biblioteca de presentación de fab eucariota transferida de forma discontinua: detección por selección de perlas magnéticas

Para demostrar que una biblioteca de Fab de presentación en levadura puede ser sometida a selección a partir de una población de células de levadura que presentan un repertorio diverso de anticuerpos Fab, se llevaron a efecto múltiples experimentos de selección usando un dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas.

El repertorio de levaduras preparado en el Ejemplo 6 se cultivó a 30°C en SDCAA+G y la expresión de anticuerpos se indujo con galactosa (como en el Ejemplo 4). La combinación de células de levadura se incubó durante 1 hora con 100 µl de perlas paramagnéticas de estreptavidina (Dynal M280, Dynal Biotech, Oslo, Noruega), en un volumen final de 1 ml de PBS al 2%.

Después de la incubación de la mezcla de levadura-perlas, los complejos de célula-perlas se lavaron durante 11 ciclos en MPBS al 2% mediante la transferencia de los complejos de un pocillo al siguiente en el dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas. Después del lavado con MPBS al 2%, se efectuaron dos etapas adicionales de lavado con PBS. En el último pocillo del dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas, los complejos de célula-perlas se suspendieron nuevamente en 1 ml de PBS y se determinaron los títulos de colonias de levaduras antes y después de la selección sembrando sobre placas de agar SDCAA+G. Las células de levadura seleccionadas se utilizaron entonces para inocular un cultivo fresco de 10 ml de SDCAA+G y se llevó a cabo un segundo ciclo de selección, como se ha descrito anteriormente.

Se determinó el porcentaje de clones positivos y negativos por ELISA de células enteras de levadura después del primer ciclo de selección y después del segundo ciclo de selección. Las células se cultivaron y se indujeron en una placa de 96 pocillos (Corning Costar, Cambridge, MA) en 100 ml de SDCAA más 2% (peso/volumen) de galactosa.

Después de la inducción, las células se lavaron durante un ciclo con PBS y se dividieron por igual en dos placas para la detección de la unión a antígeno y la presentación de la cadena pesada. En una placa, las células se suspendieron nuevamente en 100 µl de MPBS al 2% que contuvo anti-estreptavidina-HRP (0,87 µg/ml) para detectar la unión a antígeno. Las células de la segunda placa se suspendieron nuevamente en 100 µl de MPBS al 2% que contuvo anti-c-MyC (1 µg/ml) para detectar la presentación de la cadena pesada.

Después de una hora de incubación, las células se lavaron durante dos ciclos con PBS y la determinación de la unión específica se llevó a cabo mediante la resuspensión de las células en 100 µl de una disolución de TMB. Después del desarrollo del color, la reacción se detuvo mediante adición de 50 µl de ácido sulfúrico 2 N. Las células se sedimentaron por centrifugación y se transfirieron 100 µl de sobrenadante a una placa flexible de 96 pocillos (Falcon, BD Biosciences, Bedford, MA) y se registró la absorbancia a 450 nm. Para la detección de la cadena pesada, se agregaron 100 µl de MPBS al 2% que contuvo HRP anti-ratón de conejo (1:1000) a cada pocillo. Después de una hora de incubación, las células se lavaron durante dos ciclos y se detectó la presentación de la cadena pesada de la forma descrita más arriba. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Selección de Bibliotecas Fab de Levadura

Ronda	Inicio	Salida	Relación	% aglutinadores
1	$4,9 \times 10^9$	$1,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-5}$	20
2	$3,0 \times 10^9$	$3,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-4}$	100

Después de un ciclo de selección, 20% de los clones de levadura identificados para la unión a antígeno demostraron ser positivos, y después de un segundo ciclo de selección, el número de clones de levadura reactivos al antígeno fue 100%.

EJEMPLO 8: Selección de afinidad de células de levadura que presentan anti-estreptavidina: detección por citometría de flujo

En otro experimento de discriminación de afinidad, los clones EBY100 pTQ3-F2 y EBY100pTQ3-A12/pESC contienen un vector vacío pESC (Stratagene, La Jolla, CA), que porta el marcador auxótrofo Leu. El anticuerpo anti-estreptavidina F2 tiene una afinidad de 54 nM, según se determina por resonancia de plasmón (BIAcore), y el anticuerpo anti-estreptavidina A12 tiene una afinidad de aproximadamente 500 nM. Estos dos clones se cultivaron durante una noche y se diluyeron a una DO₆₀₀ de 1,0 en SDCAA más 2% (peso/volumen) de galactosa, y se

cultivaron durante 48 horas a 20°C. El clon que contiene el anticuerpo de alta afinidad (EBY100 pTQ3-F2) y el clon que contiene el anticuerpo de baja afinidad (clones EBY100 pTQ3-A12/pESC) se mezclaron a una relación de aproximadamente 1:100. El uso de los diferentes marcadores seleccionables presentes en cada clon permitió la discriminación de EBY100 pTQ3-A12/pESC (que sólo es capaz de crecer en placas selectivas de agar menos triptófano, menos leucina) de EBY100 pTQ3-F2 (que solo puede crecer en placas selectivas de agar menos triptófano). La mezcla celular se marcó como se ha descrito anteriormente, con la excepción de una dilución seriada de estreptavidina-FITC de 500 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM y 10 nM. Las células se clasificaron por citometría de flujo en un dispositivo EPIC ALTRA (Beckman Coulter, Fullerton, CA) sobre la base tanto de la expresión de LC como de la unión a antígeno. La velocidad de clasificación se estableció en 2000 células/s, y el umbral de clasificación se ajustó para recolectar 1% de la población celular con la máxima relación de FITC a PE9 (el histograma típico de FACS se muestra en la Fig. 7). Los niveles iniciales y finales de células tras la selección se titularon a diferentes concentraciones de antígeno en placas selectivas, y se determinó el número de colonias para calcular el factor de enriquecimiento y el porcentaje de recuperación del clon de máxima afinidad (Tabla 4). Estos resultados demuestran que el clon de afinidad mayor se puede recuperar preferiblemente por clasificación de citometría de flujo, y que la concentración óptima de antígeno se encuentra entre 100 nM y 25 nM para una mezcla de dos anticuerpos de $K_d = 54$ nM y K_d de aproximadamente 500 nM.

Tabla 4: Discriminación de afinidad de dos anticuerpos Fab de diferentes afinidades, presentados en levadura

Antígeno (nM) ^a	Título (-Trp) ^b	Título (-Trp/ Leu) Fab-A12 ^c	Título (-Trp)-(-Trp/ Leu) Fab-F2 ^d	Porcentaje Fab-F2 ^e	Enriquecimiento ^f
Inicial	3,2x10 ⁷	3,7x10 ⁷	4,7x10 ⁵	1,3	
Final					
500 nM	9x10 ³	8,9x10 ³	100	1,1	0,9
100 nM	1,3x10 ³	7,9x10 ²	5,6x10 ²	71	56
50 nM	2,4x10 ³	1,2x10 ³	1,2x10 ³	102	80
25 nM	1,2x10 ³	9,1x10 ²	3,2x10 ²	35	27
10 nM	1,53x10 ³	1,49x10 ³	45	3	2,3

a. Concentración de antígeno usada para marcar células de levadura antes de FACS

b. Título de placas selectivas -Trp

c. Título de placas selectivas -Trp/Leu, representativo del número de colonias de levadura que contienen la construcción de anticuerpo pTQ3-A12

d. Título de placas -Trp menos título en placas selectivas -Trp/Leu, representativo del número de colonias de levadura que contienen la construcción de anticuerpo pTQ3-F2

e. Porcentaje de células de levadura que contienen el anticuerpo de mayor afinidad pTQ3-F2

f. Relación de células de levadura positivas a negativas antes y después de la selección

EJEMPLO 9: Construcción de bibliotecas presentadas en levadura, diversificadas por PCR propensa a errores

Para demostrar la capacidad para generar nuevas bibliotecas de vectores de presentación multicatenarios, el anticuerpo Fab F2, específico para estreptavidina, se sometió a PCR propensa a errores. Se clonaron en el vector de presentación en levadura LC, HC y anticuerpo Fab total por separado. Se llevó a cabo la PCR propensa a errores en presencia de MgCl₂ 2,25 mM y MnCl₂ 0,375 mM durante 30 ciclos. Los productos purificados se clonaron en vectores de presentación en levadura pTQ3 como un fragmento *Apa*LI/*As*cl, fragmento *Sfi*II/*Not*I o fragmento *Apa*L1/*Not*I, correspondientes a la LC, HC y un fragmento de Fab completo, como en el Ejemplo 2. La mezcla de ligadura se transformó en *E. coli* y se cultivó sobre placas de agar selectivas que contuvieron 100 µg/ml de ampicilina para dar un repertorio de LC de 5 x 10⁶, designado pTQ3F2-LC^{ep}, un repertorio HC de 5,6 x 10⁶, designado pTQ3F2-HC^{ep}, y un repertorio de Fab completo, designado pTQ3F2-Fab^{ep}. Los repertorios se cosecharon y se llevó a cabo una inoculación de 200 ml (suficiente para comprender al menos 10 veces la diversidad de biblioteca). Se aisló ADN plasmídico a partir de un cultivo de 200 ml y se transformó en la cepa de levadura EBY100, tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los repertorios resultantes se designaron EBY100-pTQ3F2-LC^{ep} (tamaño = 5 x 10⁶); EBY100-pTQ3F2-HC^{ep} (tamaño = 1,7 x 10⁶); EBY100-pTQ3F2-Fab^{ep} (tamaño = 10⁶). La frecuencia de

mutación a nivel de nucleótidos fue 1,5% para la LC y 0,8% para la HC. La frecuencia de mutación a nivel de aminoácidos fue de 3% para la LC y de 1,3% para la HC.

EJEMPLO 10: Selección de afinidad de una biblioteca de células de levadura que presentan anti-estreptavidina: detección por citometría de flujo

5 Para demostrar la selección de afinidad de cultivos nocturnos de bibliotecas de presentación en levadura multicatenaria, se prepararon las bibliotecas EBY100-pTQ3F2-LC^{ep}; EBY100-pTQ3F2-HC^{ep} y EBY100-pTQ3F2-Fab^{ep} como en el Ejemplo 2, y se diluyeron a una DO₆₀₀ de 1,0 en medios selectivos que contuvieron SDCAA más 2% (peso/volumen) de galactosa, y se cultivaron durante 48 horas a 20°C. El repertorio se marcó con mAb anti-HA (25 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una segunda etapa de incubación con FITC de Ig anti-ratón de conejo (dilución 1:40) y PE estreptavidina 6 nM durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con 0,5 ml de PBS después de cada etapa de incubación y, después del lavado final, las células se conservaron en hielo para impedir la disociación del antígeno. Las muestras se clasificaron en un citómetro de flujo EPIC ALTRA con una velocidad de clasificación de 2000 células/s. El primer ciclo de clasificación se llevó a cabo en modo de enriquecimiento y el umbral de clasificación se ajustó para recolectar una población de células obtenidas sobre la base tanto de la expresión de LC como de la unión a antígeno. El porcentaje de células recolectadas se redujo con ciclos sucesivos de selección para dar cuenta de la diversidad decreciente del repertorio (Fig. 8A). A continuación, las células recolectadas se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de 1,0 a 30°C en SDCAA más (peso/volumen) glucosa, seguido de inducción con galactosa, como en el Ejemplo 2. Se repitió la selección en los ciclos 2 y 3, que se llevaron a cabo en modo de pureza con umbrales de clasificación decrecientes (Tabla 5). También se efectuó un análisis de FACS policlonal a diferentes concentraciones de antígeno, y en la Fig. 8B se muestran los histogramas de FACS tanto de la expresión de LC como de la actividad de unión a antígeno.

Tabla 5: Selección de repertorios propensos a errores

Ronda	Repertorio	Tamaño	Muestreo total	Ag (nM)	Estrategia	Modo FACS	% células recolectadas	% Unión Ag
R1	pTQ3F2LC ^{ep}	5x10 ⁶	6x10 ⁶	6	FACS	Enriquecimiento	6,0	40
R2	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	1,4	70
R3	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	0,2	75
R1	pTQ3F2HC ^{ep}	1,7x10 ⁶	3x10 ⁶	-	Kingfisher	-	-	23
R2	"	"	2x10 ⁶	6	FACS	Pureza	1,4	72
R3	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	0,5	62
R1	pTQ3F2Fab ^{ep}	10 ⁶	5x10 ⁶	6	FACS	Enriquecimiento	5,0	18
R2	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	1,4	60
R3	"	"	5x10 ⁶	6	FACS	Pureza	0,2	73

EJEMPLO 11: Análisis de Anticuerpos Fab Seleccionados

25 Los clones de levadura recuperados de la selección de afinidad de los repertorios EBY100-pTQ3F2-LC^{ep}, EBY100-pTQ3-HC^{ep}, EBY100-pTQ3F2-Fab^{ep} se identificaron por afinidad para cuantificar la mejoría de la afinidad con respecto al anticuerpo natural de partida. También, se secuenciaron los anticuerpos seleccionados para determinar las mutaciones que se correlacionan con una afinidad optimizada.

30 Se recolectaron colonias de levadura y se suspendieron nuevamente en 25 µl de disolución de liticasa (2,5 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora a 37°C, después de lo cual se tomaron 2 µl y se usaron en una reacción de PCR. Se amplificaron y secuenciaron las LC y HC separadas utilizando un secuenciador ABI-PRISM. Las mutaciones con respecto al tipo natural se determinaron usando alineación de secuencias y se muestran en la Tabla 6.

35 Tabla 6: Visión de conjunto de anticuerpos Fab mutados seleccionados a partir de repertorios propensos a error mediante FACS

ES 2 405 551 T3

Repertorio	Ciclo	Clon	Secuencia V ₁	Secuencia V _H	Señal de FACS normalizada ¹
wt-F2					1,00
F2 LC ^{ep}	R1	RIC9	F621	/	
"	R1	R1H8	S2P, D85V	/	1,42
"	R1	R1H10	<u>H34R, Y96H</u>	/	1,15
"	R2	R2H8	S2P, D85V	/	1,23
"	R2	R2H10	<u>H34R, Y96H</u>	/	1,23
"	R2	R2A7	sin mut. de a.a	/	0,95
"	R3	R2H8	S2P, D85V	/	1,9
F2 HC ^{ep}	R3	R3H4	/	<u>H53R</u>	
"		R3D2	/	<u>H53R</u> ; S62A	
F2 Fab ^{ep}	R2	R2D3	<u>H34R</u>	sin mut. de a.a	1,65
"	R2	R2G4	V11A, <u>H34N</u> , V58A, S67P, <u>L95I</u>	P40L	0
"	R3	R3B1	<u>Y96F</u>	P40L	1,78
"	R3	R3H1	"	<u>A23V, S65R</u>	1,50
"	R3	R3E1	S2P, D85V	K14E	1,56
"	R3	R3G4	"	H53R, A84T	1,70
"	R3	R3F1	<u>Q1L, K45R, L95V</u>	sin mut. de a.a	1,60
"	R3	R3A3	<u>H34R</u>	sin mut. de a.a	1,65
"	R3	R3H3	<u>H34R, Q79R</u>	Q3R	1,62

Las mutaciones subrayadas están colocadas en los bucles de CDR del anticuerpo.

Relación de intensidad de fluorescencia media de unión a Ag/intensidad de fluorescencia media de presentación de LC de clon de ensayo a anticuerpo de partida de tipo salvaje.

5 La disociación de los Fab seleccionados se determinó midiendo la velocidad de disociación en FACS como la
 disminución en la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo; el clon R2H10 produjo la mayor mejora en afinidad
 (10,7 veces, 3,2 nM). Esta velocidad de disociación se ajustó a un modelo de decaimiento exponencial y se calculó
 la k_d . Células de levadura se marcaron con tanto anti-HA para detectar la LC como también para antígeno con
 estreptavidina PE. Los cultivos de levadura se cultivaron e indujeron como se ha descrito en el Ejemplo 2 y
 10 aproximadamente 2×10^7 células se recogieron y se lavaron con PBS. Después, las células se incubaron con 100 μ l
 de Mab anti-HA (20 μ g/ml) durante 1 hora y después se lavaron con 0,5 ml de PBS. Después, las células se
 incubaron con anti-FITC de ratón de conejo (1:40) y estreptavidina PE (dilución 1:40 de lote madre 1 μ g/ml) durante
 1 hora en hielo. El sedimento celular después se resuspendió en un exceso de ligando no fluorescente a
 temperatura ambiente. La concentración de marcador no fluorescente se tomó de forma que fuera 10-100 veces
 más de la concentración molar de anticuerpo Fab presentado en levadura suponiendo que existen aproximadamente
 100.000 copias de un anticuerpo Fab por célula de levadura. La disminución en la intensidad de fluorescencia se
 15 supervisó durante 1,5 min a 30 min mediante citometría de flujo. Se usaron células de levadura no marcadas para
 ajustar la fluorescencia de fondo. Después se calculó la k_d ajustando la velocidad de disociación a un modelo de
 decaimiento exponencial a partir del cual se calculó la k_d . La Figura 10c muestra la determinación de disociación
 mediante FACS para clones F2 de tipo salvaje y mutantes R2E10, R3B1 y R3H3.

20 La afinidad de Fab solubles se determinó subclonando los anticuerpos Fab seleccionados en el vector de expresión
 de *E. coli* pCES1 como en el Ejemplo 2. Los Fab solubles se purificaron y se ensayaron para determinar afinidad a
 través de BIAcore (de Haard, H. et al.). La afinidad de Fab seleccionados se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7 Caracterización de fragmentos Fab mejorados para afinidad

Clon	Biblioteca	Variable de Mutaciones LC ^a	Variable de Mutaciones HC ^{ab}	k _d de FACS ^e (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	Biacore ^c			
					k _d (10 ⁻³ s ⁻¹)	k _a (10 ⁴ M ⁻¹ s)	k _D nM	factor
wt-F2	/	ninguno	ninguno	2,2 ± 1,0	1,52 ± 0,15	4,51 ± 0,01	34	/
R2H10	LC e.p.	H34R, Y96H	ninguno	0,5 ± 0,1	0,18 ± 0,01	5,69 ± 0,02	3,2	10,7
R3A9	"	S2P, D85V	ninguno	1,3 ± 0,1	1,53 ± 0,57	7,84 ± 0,08	19,5	1,7
R3H4	HC e.p.	ninguno	H53R	1,9 ± 0,7	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
R3D2	"	ninguno	H53R, S62A	1,6 ± 0,6	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
R2D3	fab e.p.	<u>H34R</u>	1 mut. silenciosa	2,1 ± 0,3	1,04 ± 0,10	5,76 ± 0,08	18,1	1,9
R3H1	"	<u>Y96F</u>	A23V, <u>S65R</u>	1,0 ± 0,4	0,28 ± 0,04	3,25 ± 1,14	8,7	3,9
R3G4	"	S2P, D85V	<u>H53R</u> , A84T	3,5 ± 1,1	2,37 ± 0,25	10,9 ± 1,13	21,7	1,6
R3B1	"	<u>Y96F</u>	P40L	0,9 ± 0,2	0,22 ± 0,05	4,00 ± 1,30	5,5	6,3
R3E1	"	S2P, D85V	K14E	2,1 ± 1,2	1,03 ± 0,10	7,64 ± 0,95	13,5	2,5
R3H3	"	Q79R	Q3R	2,0 ± 1,0	1,04 ± 0,04	11,3 ± 2,64	9,2	3,7

a. numeración de resto de anticuerpo de acuerdo con Kabat et al.

b. las mutaciones subrayadas están en los bucles de CDR

c. los valores presentados son las medias de tres experimentos independientes

EJEMPLO 12: Selección rápida de repertorio de fab presentado en levadura usando una combinación de selección de Kingfisher y FACS

5 Para acelerar la selección por afinidad de repertorios presentados en levadura y también para desarrollar metodologías que permitan la selección de repertorios mayores de más de 10⁸, se usó una combinación de tanto Kingfisher como la primera ronda de selección (como en el Ejemplo 4) y FACS para las últimas rondas de selección (como en el Ejemplo 5). El repertorio de LC construido en el Ejemplo 9 se cultivó durante la noche y se indujo la expresión de anticuerpo como en el Ejemplo 2. La población de células de levadura se incubó con partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y se seleccionó con Kingfisher como en el Ejemplo 4. En paralelo, se seleccionó el mismo repertorio mediante FACS como en el Ejemplo 5. El grupo de células de levadura de las campañas de selección de la ronda 1 usando Kingfisher y FACS se cultivó durante la noche y se indujo la expresión de anticuerpo como en el Ejemplo 5. Las células de levadura se marcaron como en el Ejemplo 2 y se seleccionaron mediante FACS como la segunda ronda. El análisis de los grupos seleccionados de levaduras que presentaban Fab se realizó usando FACS policlonal (véase el Ejemplo 10). Se puede observar que el porcentaje de células que se unían a antígeno aumenta más rápidamente cuando se usa Kingfisher como la primera ronda de selección preferentemente a FACS (Figura 8d).

EJEMPLO 13: Construcción de un vector de presentación eucariota de cadena pesada de Ig: pTQ5-HC

20 Como una demostración de una realización alternativa del vector de presentación eucariota multicatenario de la presente invención (específicamente, un vector de presentación eucariota multicatenario en el que las cadenas de la cadena múltiple están codificadas en vectores separados, formando de ese modo componentes separados de un conjunto de vectores), se construyó un vector de presentación en levadura eficaz en una célula de levadura hospedadora transformada con el vector para expresar, transportar y presentar un fragmento de cadena pesada de Ig como un vector de un conjunto de vectores correspondiente.

25 Se construyó un vector de presentación de fragmento de HC alterando adicionalmente el vector pTQ3 producido de acuerdo con el Ejemplo 1. El vector de presentación TQ3 se digirió con *BseRI*, identificando de ese modo un sitio de restricción diseñado del vector colocado en cada uno de los dos promotores GAL1 en tándem (véase el Ejemplo 1, SEC ID N°: 5 bases indicadas 990-995). Se retiró un fragmento de 942 pb, que abarca uno de los sitios de clonación del vector de presentación multicatenario (Fig. 3) y la cadena principal del vector de 4.868 pb que queda se purificó en gel usando técnicas conocidas en la técnica (específicamente a través de GFX PCR y el Gel Band Purification

Kit, Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). La cadena principal del vector se volvió a ligar y se transformó en *E. coli*. El vector resultante, denominado "pTQ5", se verificó usando análisis de restricción.

5 La HC para el anticuerpo anti-Fab de estreptavidina F2 se digirió por restricción a partir de pTQ3-F2 como un fragmento de 709 pb *SfiI/NotI*, se purificó y se clonó en el vector digerido con *SfiI/NotI* pTQ5. El vector de presentación de HC resultante se denominó "pTQ5-HC" (Fig. 9).

10 Se realizaron modificaciones posteriores a este vector insertando un marcador 6xHis para purificación de anticuerpos Fab solubles y recolocando el codón de parada (TAA) en el extremo del marcador myc, antes del sitio *Pac1*, para eliminar aminoácidos innecesarios. Otras modificaciones han incluido la eliminación de un sitio de restricción *XbaI* endógeno dentro del marcador selectivo Trp mediante mutagénesis dirigida al sitio. Esto se realizó para facilitar la clonación y manipulación de anticuerpos candidatos a partir del conjunto de la biblioteca CJ (Dyax Corporation, Cambridge, MA).

EJEMPLO 14: Expresión en células hospedadoras eucariotas de un vector de presentación eucariota de cadena pesada de Ig: expresión de HC en una célula de levadura haploide

15 Para demostrar la utilidad de vectores independientes de un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenarios, se insertó un vector de presentación en levadura (de un conjunto de vectores) que codificaba un fragmento de cadena pesada de Ig en una célula hospedadora eucariota y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para expresión del componente de cadena pesada de un Fab de Ig.

20 La cepa de levadura EBY100 (In Vitrogen, Carlsbad, CA) se transformó con el vector pTQ5-HC (del Ejemplo 13) y por separado con pTQ5 como un control, siguiendo procedimientos de transformación descritos previamente. Los transformantes satisfactorios, denominados EBY100 pTQ5-HC y EBY100 pTQ5 respectivamente, se cultivaron durante la noche a 30°C en 10 ml de SDCAA+G.

25 Al día siguiente los cultivos se centrifugaron y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SDCAA más galactosa al 2% (p/v) a una DO₆₀₀ de 1. Después, los cultivos celulares se cultivaron durante 24 horas a 20°C para inducir la expresión del producto de fusión de cadena pesada Aga2p. Las células se centrifugaron y lavaron dos veces en 1 ml de agua estéril y se transfirieron a un tubo eppendorf.

Los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 ml de tampón de muestra SDS-PAGE más DTT, y se aplicaron perlas de vidrio (425-600 micras) inmediatamente por debajo del menisco. La suspensión de células y perlas se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto manteniendo la suspensión en hielo entre agitaciones en vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se calentó hasta 100°C durante 5 minutos.

30 Las muestras de proteína se separaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia western. La detección de polipéptido de fusión Aga2p-HC se realizó usando un anticuerpo monoclonal anti-c-Myc conjugado a HRP (1 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia potenciada (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). El polipéptido de fusión de 45 kD Aga2p-HC se detectó aproximadamente. No se detectó producto de fusión de Aga2p-HC detectable en el clon de vector de control (vacío) EBY100 pTQ5 (Fig. 10).

EJEMPLO 15: Presentación en células hospedadoras eucariotas de un vector de presentación eucariota de cadena pesada de Ig: Presentación de HC en la superficie de una célula de levadura haploide

40 Para demostrar la capacidad de un vector de un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenarios para presentar la cadena anclada de un polipéptido multicatenario en la superficie de una célula eucariota haploide, se insertó un vector de presentación en levadura (de un conjunto de vectores) que codificaba un fragmento de cadena pesada de Ig en una célula hospedadora eucariota y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para expresión y presentación del componente de cadena pesada de un Fab de Ig.

45 Se cultivó EBY100 pTQ5-HC (del Ejemplo 14) y se indujo la expresión de anticuerpo como anteriormente. La expresión de HC se indujo mediante 48 horas de cultivo con agitación a 20°C. Las muestras de levadura se centrifugaron y el sedimento celular se resuspendió en PBS que contenía un 1 mg/ml de BSA. Dos de las muestras se centrifugaron nuevamente y los sedimentos celulares se resuspendieron por separado en 100 µl de anti-C_H1 humano (25 µg/ml; Zymed, San Francisco, CA) seguido de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron y lavaron una vez con 0,5 ml de PBS/BSA al 1% (p/v). Después, las muestras de células se incubaron con anti-FITC de ratón de conejo (dilución 1:50; Dako, Carpintería, CA) durante 1 hora en la oscuridad.

50 Para detectar la unión a antígeno, las células se marcaron con estreptavidina-FITC (dilución 1:25; Dako, Carpintería, CA) en PBS/BSA al 1% (p/v) y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Todas las muestras se centrifugaron y los sedimentos celulares se lavaron una vez con 0,5 ml de PBS y después se resuspendieron en 500 ml de PBS.

La presencia de HC unida a superficie celular-unión a antígeno se detectó mediante citometría de flujo. Antes de la inducción, las células no mostraron presentación de cadena pesada o unión a estreptavidina funcional. Después de la inducción de expresión de HC, se pudieron detectar células de levadura que sólo presentaban cadena pesada, pero no se pudo detectar unión a estreptavidina funcional como se esperaba (Fig. 11).

5 **EJEMPLO 16: Construcción de un vector de presentación eucariota de cadena ligera de Ig: pTQ6-LC**

Se construyó un vector de presentación en levadura de cadena ligera para proporcionar un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenario, *es decir*, cuando se usaba junto con el vector de presentación en levadura de cadena pesada descrito anteriormente (véase el Ejemplo 13, *más arriba*).

10 Se construyó un vector de expresión en levadura de LC amplificando un fragmento que contenía el anti-LC de estreptavidina fusionado al marcador de epítipo de HA y la secuencia de señal de Aga2p. El producto de amplificación se purificó en gel usando un GFX PCR y un Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) y se digirió con *HindIII* y *PmeI*. El fragmento de LC de 783 pb se purificó en un gel de agarosa ConTAE al 1,2% junto con la cadena principal del vector de 4.323 pb de un vector pYC6/CT digerido con *HindIII/PmeI* (InVitrogen, Carlsbad, CA). El fragmento de LC y el vector pYC6/CT se ligaron juntos y la mezcla de ligación se transformó en la cepa TG1 de *E. coli*. El vector de expresión de LC resultante se denominó "pTQ6-LC" (Fig. 12).

15 **EJEMPLO 17: Expresión en células hospedadoras eucariotas de un vector de presentación eucariota de cadena ligera de Ig: Expresión de LC soluble en una célula de levadura haploide**

20 Para demostrar la utilidad de vectores independientes de un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenarios, se insertó un vector de presentación en levadura (de un conjunto de vectores) que codificaba un fragmento de cadena ligera de Ig en una célula hospedadora eucariota, y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para expresión de un componente de cadena ligera soluble de un Fab de Ig.

25 La cepa de levadura W303-1B (*a/alpha ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/eu2-3,112 trp1-1/trp1-1 his 3-11,15/his3-11,15 ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100*), obtenida de P. Slonimski, se transformó con pTQ6-LC (del Ejemplo 16) y por separado pYC6/CT como un control, siguiendo los procedimientos de transformación descritos previamente. Los transformantes satisfactorios, denominados W303 pTQ6-LC y W303 pYC6/CT respectivamente, se cultivaron durante la noche a 30°C en 10 ml de SD-G más 300 µg/ml de Blastidicin® (SD-G+BIs).

30 Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SD + BIs más galactosa al 2% (p/v) a una DO₆₀₀ de 0,4. Después, los cultivos celulares se cultivaron durante 24 horas a 20°C para inducir la expresión del polipéptido de cadena ligera soluble. Las células se centrifugaron y los sobrenadantes se concentraron diez veces usando una unidad de filtro centrífugo (CENTRICON YM-10; Millipore, Bedford, MA).

35 Los sedimentos celulares se lavaron y resuspendieron en tampón de ruptura (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, glicerol al 5% (p/v) más cóctel inhibidor de proteasa; Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) a una DO₆₀₀ de 50, y se aplicaron perlas de vidrio (425-600 micrómetros) inmediatamente por debajo del menisco. La suspensión de células y perlas se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto manteniendo la suspensión en hielo entre agitaciones en vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se calentó una alícuota hasta 100°C durante 5 minutos en tampón de muestra de SDS-PAGE más DTT.

40 Muestras de proteína se separaron en un gel de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia western. La detección del polipéptido de LC se realizó usando un anticuerpo monoclonal anti HA (1 µg/ml) en combinación con un anti-ratón de conejo conjugado a HRP (1/1000). La inmunodetección fue mediante quimioluminiscencia potenciada (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Los productos polipeptídicos de 30 kD y 60 kD se detectaron en el sobrenadante de cultivo. No se pudo detectar producto de LC detectable en el control de vector vacío W303 pYC6/CT (Fig. 13).

45 **EJEMPLO 18: Presentación en superficie de un polipéptido multicatenario en una célula hospedadora eucariota: el producto de fusión celular de un par de células hospedadoras haploides**

50 Para demostrar la funcionalidad del nuevo procedimiento para presentar un polipéptido multicatenario biológicamente activo en la superficie de una célula eucariota diploide a través de la fusión celular de dos células eucariotas haploides, poseyendo cada una de ellas un vector diferente de un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenario correspondiente, se aparearon células de levadura haploides que contenían un vector que expresaba un fragmento de cadena ligera de Ig soluble con células de levadura haploides que contenían un vector que expresaba y presentaba un polipéptido de fusión de anclaje con cadena pesada de Ig para producir una célula de levadura diploide que presenta un polipéptido Fab funcional en la superficie de la célula hospedadora.

55 Se cultivaron los clones de levadura W303 pTQ6-LC (del Ejemplo 17) y EBY100 pTQ5-HC (del Ejemplo 14) en placas de agar complementadas con Blastidicin® (InVitrogen, Carlsbad, CA; 300 µg/ml; placas de agar de SD+G+BIs) o medio con triptófano retirado (placas de agar de SD-Trp+G). Después, estas placas se replicaron en

placas selectivas dobles que contenían medio definido sintético para retirada de triptófano más 300 µg/ml de Blastocidin® (SD-Trp+G+Blis). La capa de células resultante de células de levadura diploides se sembró en estrías para colonias únicas. Se seleccionaron siete colonias Trp+/Blis^R y se cultivaron durante la noche con agitación a 30°C en 100 ml de SD+G-Trp+Blis en placas de 96 pocillos.

5 Al día siguiente, el cultivo se centrifugó y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SD-Trp+Blis más galactosa al 2% (p/v) o 10 ml de medio YP +Blis más galactosa al 2% (p/v) durante 24 horas a 20°C. Las células se lavaron en PBS y se dividieron por igual en tres placas de 96 pocillos. Las células de la primera placa se resuspendieron en 100 µl de estreptavidina-HRP (0,87 µg/ml), las células de la segunda placa se resuspendieron 100 µl de anti-c-Myc-HRP (1 µg/ml) y las células de la tercera placa se resuspendieron en 100 µl de anti-HA (1
10 µg/ml) y se marcaron adicionalmente con un anti-HRP de ratón de conejo (1/1000).

Se realizó ELISA de células enteras de levadura (como en el Ejemplo 7) y se realizó FACS (como en el Ejemplo 15) para detectar unión a antígeno y presentación de HC. Todas las diploides ensayadas se unieron a estreptavidina y presentaron cadenas ligeras en ELISA de células enteras (Fig. 14) y FACS (Figs. 15A-C). Específicamente, la actividad de unión a estreptavidina se detectó en células de levadura diploides que presentaban anticuerpo Fab ensamblado de forma combinatoria (LC/HC diploide) en su superficie mientras que las células parentales haploides que expresaban sólo LC (W303 pTQ6-LC) o sólo HC (EBY100 pTQ5-HC) no mostraron actividad de unión. Células de levadura haploides convencionales que presentaban un anticuerpo Fab (EBY 100 pTQ3-F2) mostraron actividad de unión a estreptavidina. También (como se esperaba), la célula de levadura parental haploide que expresaba sólo LC (W303 pTQ6-LC) no mostró presentación de HC, mientras que las células de levadura haploides convencionales que presentaban un anticuerpo Fab (EBY100 pTQ3-F2) mostraron presentación de HC.
15
20

Se seleccionaron cinco clones de levadura para cultivo durante la noche a 30°C en 10 ml de SD+G-Trp+Blis con agitación. Al día siguiente, los cultivos celulares se centrifugaron y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SD-Trp+Blis más galactosa al 2% (p/v) a una DO₆₀₀ de 0,4 durante 24 horas para inducir la expresión de vector. Un protocolo alternativo implica la resuspensión en 10 ml de medio YP más Blastocidin® más galactosa al 2% (p/v).
25

Después de la incubación de inducción de 24 horas, una alícuota de cada uno de los cinco cultivos de levadura diploide se sedimentó, se lavó y se resuspendió en tampón de ruptura a una DO₆₀₀ de 50. Se añadieron perlas de vidrio (425-600 micrómetros) inmediatamente por debajo del menisco y la suspensión de células y perlas se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto manteniendo la suspensión en hielo entre agitaciones en vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y una alícuota se calentó a 100°C durante 5 minutos en tampón de muestra de SDS-PAGE más DTT.
30

Muestras de proteína se separaron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia western. La detección del polipéptido de cadena ligera se realizó usando un anticuerpo anti-HA (1 µg/ml) en combinación con un anti-ratón de conejo conjugado a HRP en una membrana. La detección del polipéptido de fusión de cadena pesada-Aga2p se realizó usando un anticuerpo anti-c-Myc conjugado directamente a HRP (1 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). La inmunodetección fue mediante quimioluminiscencia potenciada (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Tanto el producto de LC de aproximadamente 30 kD como el producto de fusión de HC-Aga2p de aproximadamente 45 kD se detectaron en el lisado de levadura diploide (Figs. 16 y 17). Se detectó producto de fusión de LC o HC-Aga2p no detectable en clones diploides de control que portaban los dos vectores vacíos pTQ5 y pYC6/CT.
35
40

También, después de la incubación de inducción de 24 horas, se analizó una segunda alícuota a partir de cada uno de los cinco cultivos de levadura diploide mediante citometría de flujo. Se lavaron 5 x 10⁶ células por agente de detección un ciclo con PBS, y las células se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía anti-c-Myc (25 µg/ml) para detección de cadena pesada, 100 µl de PBS que contenía anti-estreptavidina-FITC (1:40) para detección de unión a antígeno y 100 µl de PBS que contenía anti-HA (25 µg/ml) para detección de cadena ligera. Las células se incubaron durante una hora en la oscuridad y después se lavaron de nuevo un ciclo con PBS. Después del lavado, las células se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía anti-FITC de ratón de conejo (1:40) y se incubaron de nuevo durante una hora en la oscuridad.
45

Las células con anti-estreptavidina-FITC se procesaron durante la segunda etapa de incubación debido al marcaje de una etapa. Después de la incubación, las células se lavaron durante un ciclo adicional, y se resuspendieron en 500 µl de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Las cinco muestras demostraron que se unían al antígeno y que presentaban la HC así como la LC (Figs. 15A-C).
50

Después de la incubación (inducción) de 24 horas, también se marcó una tercera alícuota a partir de uno de los cinco cultivos de levadura diploides para inmunofluorescencia. Se resuspendieron 10⁸ células en 100 µl de estreptavidina-FITC (30 µg/ml, Dako) o de una mezcla de anti-cadena lambda humana de conejo (1:40; Dako, Carpintería, CA) y anti-C_H1 monoclonal (25 µg/ml, Zymed, San Francisco, EE.UU.). Una primera muestra se incubó adicionalmente con anti-FITC de conejo (1:40; Dako, Carpintería, CA) y finalmente con anti-conejo de cerdo conjugado a FITC (1:20; Dako, Carpintería, CA). Una segunda muestra se sometió a un marcaje doble con anti-
55

conejo de cerdo conjugado a FITC (1:20; Dako, Carpintería, CA) para la cadena ligera y anti-ratón de conejo conjugado a isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC, 1:30, Sigma, St. Louis, MO) para la cadena pesada (Figs. 18A-C).

5 Las diploides presentaron la cadena ligera y la cadena pesada en la superficie celular y demostraron que se unían a estreptavidina, como se esperaba. Las células parentales haploides que sólo expresaban HC se tiñeron sólo mediante el marcaje con TRITC de la cadena pesada. La célula parental haploide de LC fue negativa en todos los casos.

EJEMPLO 19: Eficacia de apareamiento de un par de células de levadura hospedadoras haploides

10 Para demostrar la eficacia de fusión celular de dos células de levadura haploides, cada una de las cuales posee un vector diferente a partir de un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenario correspondiente como un procedimiento viable para generar células de levadura diploides que presentan un polipéptido multicatenario biológicamente activo en su superficie, se determinó la eficacia de apareamiento para un par de células de levadura hospedadoras de acuerdo con la presente invención. La determinación cuantitativa de la eficacia de la reacción de apareamiento se evaluó de la manera siguiente.

15 Cada célula parental haploide EBY100 pTQ5 (del Ejemplo 14) y W303 pYC6/CT (del Ejemplo 17) se cultivó durante la noche a 30°C en el medio selectivo apropiado SD+G-Trp y SD+G+Blis respectivamente. 3×10^7 células de los dos cultivos haploides nuevos se mezclaron y recogieron en un filtro de nitrocelulosa de 45 mm (dispositivo microfill de Millipore, Bedford, MA). El filtro se incubó durante 4 horas a 30°C en una placa de medio rico no selectivo (YPD).
20 Después, las células se resuspendieron en medio YPD y se titularon en los dos medios selectivos parentales y en el medio selectivo doble (que sólo permite el crecimiento de las diploides) SD+G-Trp+Blis. La inversión o resistencia espontánea se evaluó procesando cada célula parental haploide por separado de la misma manera y sembrándolas en placas en el medio selectivo doble sin dilución.

25 La eficacia de apareamiento de la célula parental haploide EBY100 pTQ5 se calculó de la manera siguiente: (el número de diploides en desarrollo en SD+G-Trp+Blis menos el número de EBY100 pTQ5 resistentes espontáneas en desarrollo en SD+G-Trp+Blis) dividido entre (el número total de células de la reacción de apareamiento que mostraban crecimiento en SD+G-Trp).

La eficacia de apareamiento de la célula parental haploide W303 (pYC6) se calculó de la manera siguiente: (el número de diploides en SD+G-Trp+Blis menos el número de células haploides W303pYC6/CT en desarrollo en SD+G-Trp+Blis) dividido entre (el número de células en SD+G+Blis).

30 3×10^7 células haploides de cada tipo de apareamiento produjeron $1,5 \times 10^7$ células diploides que contenían los vectores de expresión en levadura tanto pTQ5 como pYC6. Los resultados de eficacia de apareamiento revelaron que el 51% de células parentales haploides que contenían el plásmido pTQ5 formaron diploides, y que el 64% de células parentales haploides que contenían el plásmido pYC6 formaron diploides.

EJEMPLO 20: Enriquecimiento preferencial de células de levadura diploides que presentan un anticuerpo Fab ensamblado de forma combinatoria: detección mediante citometría de flujo

35 Para confirmar la capacidad de seleccionar células de levadura que presentan un anticuerpo Fab específico de antígeno con respecto a un exceso de células de levadura no pertinentes, se usó clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se usó una célula de levadura diploide positiva que presentaba un anticuerpo Fab ensamblado de forma combinatoria específico para estreptavidina. La célula de levadura diploide portaba los marcadores fenotípicos de Trp⁺/Leu⁻/Blis^R, y fue capaz de crecer en placas de agar selectivas que contenían Blastocidin® y menos triptófano. Esta diploide se denominó la diploide Blis^R. Se usó una célula diploide de levadura no pertinente que portaba los marcadores fenotípicos Trp⁺/Leu⁺, y fue capaz de crecer en placas de agar selectivas que contenían menos leucina y triptófano. Esta diploide se denominó la diploide Leu⁺. Las células de levadura diploides tanto positivas (Blis^R) como no pertinentes (Leu⁺) se cultivaron durante la noche en medio de SD más glucosa al 2% (p/v) en condiciones selectivas de medio de -Trp/+Leu/+Blis y medio -Trp/-Leu respectivamente.
40 Los cultivos de levadura se indujeron en medio YP que contenía galactosa al 2% (p/v). Después de determinar la DO₆₀₀ del cultivo de levadura, y usando el factor de conversión de DO₆₀₀ de 1 es equivalente a 4×10^6 células/ml, se preparó una mezcla de células de levadura positivas a no pertinentes en una relación aproximada de 1:10000. Para selección mediante FACS, la mezcla de células de levadura se marcó con estreptavidina PE 500 nM y se seleccionó como en el Ejemplo 8. Para Kingfisher, la mezcla de células de levadura se incubó con perlas recubiertas con estreptavidina y se seleccionó como en el Ejemplo 4. Para la selección mediante MACS, se incubaron diploides inducidas durante una hora a temperatura ambiente con 500 µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en 6 ml de PBS + EDTA 2 mM. La mezcla de células/perlas se cargó en una columna de LS prelavada (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en presencia de un imán y la columna se lavó de nuevo dos veces
50 con PBS + EDTA 2 mM. Después de retirar el imán, las células retenidas en la columna se eluyeron en 6 ml de tampón PBS.
55

Las células de levadura se recuperaron y titularon en placas de agar selectivas para el fenotipo Bla^R o el fenotipo Leu⁺. La proporción de colonias de Bla^R/Leu⁺ antes y después de la selección se usó para calcular el factor de enriquecimiento y el porcentaje de recuperación de células de levadura positivas.

Tabla 8: Experimentos de enriquecimiento de pasada única usando MACS, Kingfisher y FACS

Dispositivo	Aporte			Producción			Recuperación	Enriquecimiento
	Diploide Leu ⁺	Diploide Bla ^R	(%) de Bla ^R /Leu ⁺	Diploide Leu ⁺	Diploide Bla ^R	(%) de Bla ^R /Leu ⁺		
MACS	5x10 ⁸	4x10 ⁴	0,008	3x10 ⁵	10 ⁴	3,6	25%	465
Kingfisher	6x10 ⁸	4x10 ⁴	0,0065	600	750	125	1,8%	19230
FACS	2x10 ⁷	10 ⁴	0,05	204	6	3,4	N.R	68

5

En el ejemplo dado de un anticuerpo específico para estreptavidina, se observó que Kingfisher producía un factor de enriquecimiento mayor que MACS. Sin embargo, el porcentaje de recuperación de células de levadura positivas fue significativamente menor. Usando FACS, se observó un factor de enriquecimiento de un orden de magnitud de una ronda de selección para un anticuerpo Fab anti-estreptavidina.

10 **EJEMPLO 21: Recombinación de LC y HC mediante fusión celular de un par de células hospedadoras haploides y selección por afinidad: detección mediante citometría de flujo**

15 Para ilustrar la utilidad de la fusión de dos células eucariotas haploides, poseyendo cada una de ellas un vector diferente a partir de un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenarios correspondiente, se apareó una población de células de levadura haploides que contenía un vector que expresaba una pluralidad de variantes de fragmento de cadena ligera de Ig soluble (*es decir*, una biblioteca de variantes de LC) con una población de células de levadura haploides de tipo de apareamiento opuesto que contenía un vector que expresaba y presentaba una pluralidad de variantes de polipéptido de fusión de anclaje con cadena pesada de Ig (*es decir*, una biblioteca de variantes de HC) para producir una población nueva de células de levadura diploides que presenta una pluralidad de polipéptidos Fab funcionales en la superficie de las células hospedadoras (*es decir*, una biblioteca de Fab nueva).

20 Aislados de presentación en fago de Fab, preseleccionados para una molécula diana a partir de un repertorio de Fab, se usan para proporcionar los componentes fuente de cadena ligera y cadena pesada para una transferencia discontinua de la información genética del aislado de presentación en fago a un conjunto de vectores de presentación en levadura multicatenarios (como se ha demostrado en el Ejemplo 6), usando el conjunto de vectores de presentación en levadura multicatenarios (como se ha descrito en los Ejemplos 14 y 17) para proporcionar nueva recombinação de aislados de cadena ligera y pesada a través de la fusión de células hospedadoras de dos células eucariotas haploides, poseyendo cada una de ellas un vector diferente a partir de un conjunto de vectores de presentación eucariota multicatenario correspondiente (como se ha demostrado en el Ejemplo 18).

25 Una biblioteca de anticuerpo de presentación en fago (de Haard, H. et al., 1999) se sometió a una ronda de selección en partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina usando protocolos familiares para los especialistas en la técnica. Este repertorio se usó como un repertorio de partida para transferencia en el sistema de presentación en levadura. La aportación de la biblioteca fue 5×10^{12} partículas de fago y la producción después de una ronda de selección fue $3,75 \times 10^5$ partículas de fago.

30 Los fragmentos de HC se aislaron a partir de la biblioteca de presentación en fago seleccionada de la ronda 1 como fragmentos *Sfil/NotI* y se clonaron en el vector de presentación en levadura de cadena pesada de Ig pTQ5, que se digirió con *Sfil* y *NotI* (Ejemplo 13). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca de 10^9 . Después esta biblioteca se transformó en la cepa de levadura EBY100 para producir una biblioteca de 4×10^7 y denominada EBY100-pTQ5-HC^{rep}.

35 Los fragmentos de LC se aislaron a partir de la biblioteca de presentación en fago seleccionada de la ronda 1 como fragmentos *ApaI/AscI* y se clonaron en el vector de presentación en levadura de cadena ligera de Ig pTQ6, que se digirió con *ApaI* y *AscI* (Ejemplo 16). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca de 1×10^8 . Después, esta biblioteca se transformó en la cepa de levadura BJ5457 para producir una biblioteca de 8×10^7 y se denominó BJ5457-pTQ6-LC^{rep}. Los repertorios tanto de HC como LC en levaduras contenían suficiente diversidad para cubrir el repertorio de partida de $3,75 \times 10^5$ en fago. El análisis de identificación genética de ADN de clones individuales mostró diversos patrones de restricción que indican que segmentos diferentes de línea germinal estaban representados en las bibliotecas separadas de LC y HC.

45

En el primer régimen de apareamiento, $7,25 \times 10^8$ células del repertorio de LC (BJ5457-pTQ6-LC^{rep}) se aparearon con $3,4 \times 10^8$ células de EBY100-pTQ5-F2HC que contenían la HC única específica para estreptavidina y obtenida a partir del clon F2. Las condiciones de apareamiento fueron bajo presión selectiva para mantener los plásmidos de expresión tanto de LC como de HC (auxotrofia de triptófano y resistencia a blastocidina). Se obtuvo una biblioteca de $1,9 \times 10^8$ diploides con una eficacia de apareamiento del 55%. El análisis de clones individuales de esta biblioteca mediante ELISA de células enteras de levadura mostró que el 100% de clones presentaba una HC y el 100% de clones presentaba una LC.

En un segundo régimen de apareamiento, $3,6 \times 10^8$ células del repertorio de HC (EBY100-pTQ5-HC^{rep}) se aparearon con 3×10^8 células de BJ5457-pTQ6-F2LC que contenían una LC única específica para estreptavidina y obtenida a partir del clon F2. Las condiciones de apareamiento fueron bajo presión selectiva para mantener los plásmidos de expresión tanto de LC como de HC (auxotrofia de triptófano y resistencia a blastocidina). Se obtuvo una biblioteca de 8×10^7 diploides con una eficacia de apareamiento del 27%. El análisis de clones individuales a partir de esta biblioteca mediante ELISA de células enteras de levadura mostró que el 89% de los clones presentaba una HC y todos estos clones presentaban una LC.

En un tercer régimen de apareamiento, $2,0 \times 10^{10}$ células del repertorio de HC (EBY100-pTQ5-HC^{rep}) se aparearon con $5,6 \times 10^9$ células del repertorio LC (BJ5457-pTQ6-LC^{rep}). Las condiciones de apareamiento fueron bajo presión selectiva para mantener los plásmidos de expresión tanto de LC como de HC (auxotrofia a triptófano y resistencia a Blastocidin®). Se obtuvo una biblioteca diploide de 4×10^9 con una eficacia de apareamiento del 68%. El análisis de clones individuales a partir de esta biblioteca mediante ELISA de células enteras de levadura mostró que el 94% de clones presentaba una HC y el 53% de clones presentaba una LC.

Esta serie de experimentos de apareamiento muestra que se pueden preparar bibliotecas grandes usando el apareamiento de repertorios separados de LC y HC. Estos repertorios comprenden diversos segmentos de línea germinal de gen V, y se pueden expresar y presentar en la superficie de células de levadura. Estos repertorios se seleccionaron con el antígeno estreptavidina usando Kingfisher (véase el Ejemplo 7). Después de dos rondas de selección, el 97% de los clones recuperados mostraron actividad de unión a antígeno en un ELISA de células enteras de levadura (véase el Ejemplo 7).

EJEMPLO 22: Construcción de repertorios de LC y HC diversificados mediante PCR propensa a error

Para demostrar la fusión de dos repertorios de células de levadura haploides, poseyendo cada una de ellas un vector diferente a partir de un conjunto de vectores multicatenarios correspondiente, que se puede usar para maduración de la afinidad, se construyeron un repertorio de HC diversificado mediante PCR propensa a error (Ejemplo 9) en pTQ5 (Ejemplo 13) y un repertorio de LC separado diversificado por PCR propensa a error (Ejemplo 9) en pTQ6 (Ejemplo 16) en células haploides de levadura de tipo de apareamiento opuesto.

El repertorio de HC se construyó amplificando el anticuerpo anti-estreptavidina F2 en condiciones propensas a error (Ejemplo 9). El fragmento amplificado se digirió con *Sfi*I y *Not*I, se purificó y clonó en el vector de expresión de sólo HC pTQ5 (Ejemplo 13), que también se había digerido con *Sfi*I y *Not*I. La mezcla de ligación resultante se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca de 7×10^7 . Esta biblioteca se transformó en la cepa de levadura EBY100 para producir una biblioteca de 9×10^6 y se denominó EBY100 pTQ5-HC*.

El repertorio de LC se construyó amplificando la LC del anticuerpo anti-estreptavidina F2 en condiciones propensas a error (Ejemplo 9). El fragmento amplificado se digirió con *Apa*L1 y *Asc*I y se clonó en el vector de expresión sólo de LC (Ejemplo 16), que también se había digerido con *Apa*L1 y *Asc*I. La mezcla de ligación resultante se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca 4×10^7 , y ésta se transfirió posteriormente a la cepa de levadura BJ5457 para producir una biblioteca de $1,8 \times 10^7$ (denominada BJ5457 pTQ6-LC*).

La frecuencia de mutación resultante a nivel de nucleótido fue del 0,8% para el repertorio de HC y del 1,5% para el repertorio de LC. Estas frecuencias corresponden al 1,3% y el 3% de frecuencia de mutación a nivel de aminoácido, respectivamente. Los repertorios de células haploides EBY100 pTQ5-HC* y el BJ5457 pTQ6-LC* se inocularon con $10 \mu\text{l}$ y $30 \mu\text{l}$ de lote madre de glicerol respectivamente, de forma que al menos 10 copias de cada clon independiente estuviera representada y se cultivara durante la noche en medio selectivo (Ejemplo 18). Se aparearon aproximadamente $1,6 \times 10^{10}$ células haploides correspondientes a BJ5457 pTQ6-LC* y 3×10^{10} células haploides correspondientes a EBY100 pTQ5-HC* (Ejemplo 19) para producir un repertorio diploide de 5×10^9 cuando se cultivaba en medio selectivo (denominado EBY100 pTQ5-HC*/BJ5457 pTQ6-LC*). Diez clones se eligieron y ensayaron mediante PCR de colonia de levadura (Ejemplo 11) para determinar la presencia de vectores que contenían LC y HC, y todos produjeron el producto de LC y HC esperado. Para determinar la fracción del repertorio diploide EBY100 pTQ5-HC*/BJ5457 pTQ6-LC* que presentaba un producto de HC y también demostraba unión al antígeno estreptavidina, se realizó un ELISA de células enteras de levadura (Ejemplo 7). El 68% (15/22) de diploides ensayados presentaron una HC y el 18% (4/22) de clones diploides ensayados mostraron unión a estreptavidina.

Para resaltar la versatilidad del procedimiento, se realizaron experimentos de apareamiento jerárquicos similares en los que el tipo salvaje de HC o el tipo salvaje de LC se mantuvieron constantes mientras se variaba sólo la cadena opuesta correspondiente. Usando el Fab anti-estreptavidina F2 como el anticuerpo modelo, se preparó un repertorio

diploide para aparear EBY100-pTQ5-F2HC y BJ5457 pTQ6-LC*. Este repertorio diploide tiene una HC constante y una LC variable. El apareamiento dio como resultado 100% de diploides que presentan una HC y 30% que muestra unión a antígeno mediante ELISA de células enteras de levadura. De forma similar, se preparó un repertorio diploide apareando BJ5457 pTQ6-F2LC con EBY100 pTQ5-HC*. Este repertorio diploide tiene una LC constante y una HC variable. Este apareamiento dio como resultado 70% de diploides que presentan una HC y 45% que muestra actividad de unión a antígeno mediante ELISA de células enteras de levadura.

EJEMPLO 23: Selección por afinidad de un repertorio de Fab ensamblado de forma combinatoria

Para demostrar que un repertorio de células de levadura que presenta una pluralidad de anticuerpos Fab ensamblados de forma combinatoria diversificado por PCR propensa a error se puede seleccionar por afinidad, se usó una combinación de selección mediante Kingfisher y separación citométrica de flujo que funciona con afinidad para recuperar los clones de afinidad óptima.

Se preparó un cultivo durante la noche (Ejemplo 18) del repertorio diploide EBY100pTQ5-HC*/BJ5457pTQ6-LC* (Ejemplo 22). El cultivo se indujo como en el Ejemplo 18 y un total de 10^{10} células se sometieron a una ronda de selección por Kingfisher (Ejemplo 7). Las células diploides de levadura de unión a antígeno se recuperaron y sometieron a selección que funciona con afinidad de FACS (véase el Ejemplo 20). El porcentaje de clones de unión a antígeno aumentó durante la selección como se determinó mediante ELISA de células enteras de levadura (Ejemplo 7). El porcentaje de clon de unión a antígeno también aumentó y la intensidad de fluorescencia media de antígeno determinada por FACS aumentó durante la selección (Tabla 9).

Tabla 9: Selección de repertorio propenso a error de LC/HC apareado mediante combinación de Kingfisher y FACS

Ronda	Conc. de Ag	Células de aportación	Células de producción	% de células acotadas	% de unión ELISA	% de unión a Ag FACS	MIF de Ag
R0	-	-	-	-	18%	2,5%	1,46
R1	perlas	10^{10}	5×10^6	na	85%	35%	2,99
R2	6 nM	10^7	10^5	1,3%	68%	32,2%	7,62
R3	2 nM	10^6	7.500	0,7%	NR	NR	NR

El progreso de la campaña de selección se supervisó usando análisis de FACS policlonal donde se preparó un cultivo durante la noche de los repertorios seleccionados a partir de cada ronda de selección y la expresión de anticuerpos se indujo como en el Ejemplo 18. Las células de levadura se marcaron como en el Ejemplo 20 y se analizaron mediante FACS para tanto presentación de LC (marcador FITC) como unión a antígeno (marcador PE).

Los clones seleccionados se secuenciaron, y las mutaciones en la LC variable y la HC variable se muestran en la Tabla 10. La afinidad de Fab seleccionados se determinó usando FACS mediante un ensayo de detección de disociación (Ejemplo 10) o mediante un análisis de mínimos cuadrados no lineal (datos no mostrados).

Tabla 10: Análisis de anticuerpos Fab seleccionados a partir de biblioteca combinatoria generada mediante apareamiento de levadura

Clon	Mutaciones de LC	Mutaciones de HC	FACS k_d e-4s-1	Aumento de factor	K_d FACS (nM)	Aumento de factor
wt-F2	-	-	2,4	1	48	1
R2-12	wt	S19F	3	0,8	29	1,6
R2-11	T5A; H34R	Q3R; Q77L	1	2,4	23	2,1
R3-6	wt	N32K; I69V; Q101V	2,1	1,1	14	3,4
R3-9	wt	H53R; Q3R; G31R	1.1	2,2	20	2,4
R3-1	wt	G8S; S54R; T68S	-	-	-	-
R3-4	T24S; H34R	wt	-	-	-	-

Clon	Mutaciones de LC	Mutaciones de HC	FACS k_d <i>e-4s-1</i>	Aumento de factor	K_d FACS (nM)	Aumento de factor
R3-2	H34R; L95H; Q79H	wt	1,6	1,5	35	1,4
R3-7	H34R; D32Y; P59S; T69S; A74T	A23D	0,7	3,4	17	2,8
R3-8	S27G; T76A	H53R	-	-	-	-

EJEMPLO 24: Redistribución de grupos seleccionados de LC y HC

Para demostrar la versatilidad del procedimiento y la capacidad de realizar ciclos recursivos de selección y redistribución, se volvieron a redistribuir grupos de LC y HC seleccionados a partir de la producción de la tercera ronda de selección (Ejemplo 23) del repertorio combinatorio EBY100 pTQ5-HC*/BJ5457 pTQ6-LC*.

Se preparó ADN plasmídico usando un tratamiento de litocasa (Ejemplo 11) y el extracto de ADN que contenía plásmidos de expresión tanto pTQ5-HC*^{sel} como pTQ6-LC*^{sel} que contenían LC y HC seleccionadas se transformó directamente en células nuevas EBY100 y BJ5457, respectivamente. La mezcla de transformación se cultivó en placas selectivas de forma que sólo pudieran crecer colonias de BJ5457-pTQ6-LC*^{sel} (placas de agar selectivas que contenían blastocidina) o de EBY100 pTQ5-HC*^{sel} (placas de agar selectivas menos triptófano). La transformación de BJ5457 pTQ6-LC*^{sel} produjo 250 colonias y la transformación de EBY100 pTQ5-HC*^{sel} produjo 25 colonias. Estos dos mini-repertorios se recogieron y cultivaron durante la noche y se aparearon como en el Ejemplo 18. Esta reacción de apareamiento produjo un repertorio diploide de EBY100 pTQ5-HC*^{sel}/BJ5457 pTQ6-LC*^{sel} que cubrió la diversidad combinatoria teórica de 6250 combinaciones diferentes de LC/HC. La expresión de anticuerpo Fab se indujo en el cultivo diploide y se seleccionó usando AutoMACS. Esto representó la cuarta ronda de selección. Se recuperó el cultivo diploide a partir de la cuarta ronda de selección. La expresión de anticuerpo se indujo, seguida de marcaje con estreptavidina PE a 0,5 nM y selección usando FACS (Ejemplo 20).

Tabla 11: Análisis de anticuerpos Fab

Clon	Mutaciones de LC	Mutaciones de HC	FACS k_d <i>e-4s-1</i>	Aumento de factor	k_d FACS (nM)	Aumento de factor
wt-F2	-	-	2,4	-1	48	1
R5-1	H34R; D32Y; P59S; T69S; A74T	N32K; I69V; Q101V	0,8	2,9	4,2	11,5
R5-12	H34R; D32Y; P59S; T69S; A74T	S19F	1	2,4	11,5	4,2

EJEMPLO 25: Construcción de un vector de presentación en levadura de repertorio de HC sin tratar y célula hospedadora haploide

Para producir un vector de presentación eucariota de cadena pesada nuevo útil como un componente de un conjunto de vectores eucariota multicatenario, se clonó un repertorio sin tratar de HC en el vector pTQ5 (Ejemplo 13).

Fragmentos de HC de anticuerpo se aíslan a partir de una fuente de linfocitos de sangre periférica de gen V y se aíslan mediante métodos de PCR de anticuerpo conocidos en la técnica. La biblioteca de HC se captura en un vector de presentación en fago siguiendo técnicas conocidas en la técnica, y después se transfiere a pTQ5 como un fragmento *Sfil/NotI* y se transforma en *E. coli*, produciendo una biblioteca de aproximadamente 1×10^8 . Después, la biblioteca se transforma en la cepa de levadura EBY100, produciendo biblioteca EBY100pTQ5-HC*^{rep} de aproximadamente 1×10^7 .

EJEMPLO 26: Construcción de un vector de presentación en levadura de repertorio de LC sin tratar y célula hospedadora haploide

Para producir un vector de presentación eucariota de cadena ligera nuevo, útil como un componente de un conjunto de vectores eucariota multicatenarios, se clona un repertorio sin tratar de LC en el vector pTQ6 (Ejemplo 16).

Fragmentos de LC de anticuerpo se aíslan a partir de una fuente de linfocitos de sangre periférica de gen V y se aíslan mediante métodos de PCR de anticuerpo conocidos en la técnica. La biblioteca de LC se captura en un vector de presentación en fago siguiendo técnicas conocidas en el campo y después se transfiere a pTQ6 como un fragmento *Apa*LI/*Ascl* y se transforma en *E. coli*, produciendo una biblioteca de aproximadamente 1×10^8 . Después la biblioteca se transforma en la cepa de levadura W303, produciendo biblioteca W303 pTQ6-LC*rep de aproximadamente 1×10^7 .

EJEMPLO 27: Una biblioteca de recombinación de LC/HC a través de fusión celular de un par de células hospedadoras haploides y posterior selección por afinidad: detección mediante citometría de flujo

Para producir una biblioteca de presentación en levadura (diploide) de Fab nueva, dos poblaciones celulares hospedadoras (haploide): una población que contiene un repertorio de fragmentos de cadena ligera y la segunda población que contiene un repertorio de fragmentos de cadena pesada, se cocultivan en condiciones suficientes para permitir la fusión celular y la población diploide resultante se cultiva en condiciones suficientes para permitir la expresión y presentación de la biblioteca de Fab recombinada (LC/HC).

Aproximadamente 10^{10} células de levadura EBY100 pTQ5-HC*rep (del Ejemplo 26) se aparean con aproximadamente 10^{10} células de levadura W303 pTQ6-LC*rep (del Ejemplo 22) siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 18. El diez por ciento de eficacia de apareamiento da como resultado un repertorio diploide de aproximadamente 10^9 (capturando de este modo aproximadamente 10^9 combinaciones de LC/HC del máximo posible de diversidad combinatoria de LC/HC de 10^{14} , dada la diversidad de partida de los repertorios de LC y HC componentes individuales en las células parentales haploides). El repertorio diploide se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (Ejemplo 15). El cultivo diploide se incuba con estreptavidina-FITC y se selecciona por afinidad usando clasificación citométrica de flujo (véase el Ejemplo 8). Las variantes de afinidad se detectan mediante determinación de la disociación usando citometría de flujo (véase el Ejemplo 9) y adicionalmente mediante técnicas de resonancia de plasmón superficial conocidas en la técnica, usando anticuerpos Fab solubles.

EJEMPLO 28: Producción de una biblioteca de par de células hospedadoras de presentación multicatenario: repertorios de células de levadura haploides de LC y HC a través de esporulación de diploides

Como un ejemplo de una nueva biblioteca de par de células hospedadoras, en la que una población celular expresa una pluralidad de variantes de una cadena de un polipéptido multicatenario biológicamente activo unido a una proteína de anclaje y la segunda célula expresa una pluralidad de variantes de una segunda cadena soluble del polipéptido multicatenario, aislados de levadura que presentan Fab diploides que se producen como resultado de la detección de selección de estreptavidina como se ha descrito en el Ejemplo 23 se inducen a esporular cultivando los aislados en condiciones de privación de nitrógeno (como se ha descrito en Guthrie y Fink, 1991). Los diploides esporulados se recogen, se tratan con zimolasa, se someten a ultrasonidos y se siembran en placas enriquecidas.

Las colonias haploides se separan en dos submuestras: una submuestra se cultiva en condiciones para facilitar la pérdida del vector de expresión de LC pero se selecciona para el vector de presentación de HC, la segunda submuestra se cultiva en condiciones para facilitar la pérdida del vector de presentación de HC pero se selecciona para el vector de expresión de LC (para plásmidos obtenidos de 2μ en condiciones no selectivas, la pérdida de plásmido está entre el 2-6% por generación). Después de varias generaciones, cada subcultivo de levadura se depura eficazmente de vector que expresa la cadena no seleccionada y contiene sólo el vector de expresión seleccionado (LC o HC), produciendo de este modo dos células de levadura haploides de expresión de cadena única desviadas (*es decir*, preseleccionadas), denominadas "HAPLOID pTQ6-LC*sel" y "HAPLOID pTQ5-HC*sel". A partir de estas dos poblaciones de levadura haploides, conteniendo cada una de ellas la cadena ligera de los Fab preseleccionados o la cadena pesada de Fab preseleccionados, se establecen tres regímenes de apareamiento de la manera siguiente:

En el primer régimen de apareamiento, 10^9 HAPLOID pTQ6-LC*sel de levadura se aparean de nuevo con 10^9 EBY100 pTQ5-HC*rep de levadura (del Ejemplo 21) y se cultivan en condiciones selectivas para el mantenimiento de plásmidos de expresión en levadura tanto LC como HC. El diez por ciento de la eficacia de apareamiento da como resultado aproximadamente 10^8 diploides. El repertorio de diploides se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (Ejemplo 18). El cultivo diploide resultante representa un repertorio desviado que contiene combinaciones únicas del repertorio de HC original frente al repertorio de LC preseleccionado, que se puede explorar adicionalmente mediante, *por ejemplo*, técnicas de separación citométrica de flujo (Ejemplos 8 y 11) y/o resonancia de plasmón superficial conocidas en la técnica, usando anticuerpos Fab solubles.

En el segundo régimen de apareamiento, 10^9 HAPLOID pTQ6-HC*sel de levadura se vuelven a aparear con 10^9 W303 pTQ6-LC*rep de levadura (Ejemplo 22) y se cultivan en condiciones selectivas para mantenimiento de plásmidos de expresión en levadura tanto de LC como de HC. El diez por ciento de eficacia de apareamiento da como resultado aproximadamente 10^8 diploides. El repertorio de diploides se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (Ejemplo 18). El cultivo diploide resultante representa un repertorio desviado que contiene combinaciones únicas del repertorio de LC original frente al repertorio de HC preseleccionado, que se puede explorar adicionalmente mediante, *por ejemplo*, técnicas de separación citométrica de flujo (Ejemplos 8 y 11) y/o resonancia de plasmón superficial conocidas en el campo, usando anticuerpos Fab solubles.

Finalmente, en el tercer régimen de apareamiento, 10^9 HAPLOID pTQ6-LC*^{sel} de levadura se aparean con 10^9 HAPLOID pTQ6 HC*^{sel} de levadura y se cultivan en condiciones selectivas para mantenimiento de plásmidos de expresión en levadura tanto de LC como de HC. El diez por ciento de la eficacia de apareamiento da como resultado aproximadamente 10^8 diploides. El repertorio de diploides se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (véase el Ejemplo 18). El cultivo diploide resultante representa un repertorio de recombinación desviado que contiene combinaciones únicas del repertorio de LC preseleccionado frente al repertorio de HC preseleccionado, que se puede identificar adicionalmente mediante, por ejemplo, técnicas de separación citométrica de flujo (Ejemplos 8 y 11) y/o resonancia de plasmón superficial conocidas en el campo, usando anticuerpos Fab solubles.

EJEMPLO 29: Maduración de la afinidad mediante diversificación basada en restricción de un anticuerpo Fab

Para demostrar la utilidad de diversificación basada en restricción y redistribución de un anticuerpo Fab para maduración de la afinidad usando presentación y selección en levadura, se prepara una biblioteca de anticuerpo Fab a partir de un Fab específico de diana candidato en el que la LC entera o un fragmento de la HC se diversifica usando clonación basada en restricción. En un método preferido, se usa una biblioteca de anticuerpo construida con sitios de restricción que agrupa tanto la secuencia de gen V de anticuerpo como también es interna a la secuencia de gen V para preparar una pluralidad de fragmentos de gen de anticuerpo para clonar y de este modo conducir a la diversificación del anticuerpo candidato.

Se puede madurar la afinidad de los anticuerpos candidatos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpo de este tipo (*por ejemplo*, el conjunto de biblioteca CJ, Dyax Corp., Cambridge, MA) mediante este enfoque. Los anticuerpos que comprenden, por ejemplo, la biblioteca de fagémidos CJ tienen una LC acotada por un sitio de restricción *Apa*L1 y *Ascl* único y una HC acotada por un sitio de restricción *Sfi*I y *Not*I único. La HC también contiene un sitio de restricción *Xba*I único e interno entre la secuencia de CDR2 y CDR3.

Para diversificar la LC en un anticuerpo candidato específico de antígeno único o un grupo de anticuerpos candidatos específicos de antígeno, el gen o los genes de anticuerpo Fab se clonan en primer lugar en el vector de presentación en levadura pTQ3 como en el Ejemplo 2, dando como resultado pTQ3-Fab. Una pluralidad de LC se aísla a partir de una preparación de ADN de la biblioteca de fagémido CJ mediante digestión de restricción con las enzimas de restricción de *Apa*L1 y *Ascl*. pTQ3-Fab también se digiere con *Apa*L1 y *Ascl*, y la LC endógena se reemplaza por una pluralidad de LC dando origen a un repertorio pTQ3-LC^{ci-rep}. Después, este repertorio se transfiere a la cepa de levadura EBY100 para producir EBY100 pTQ3-LC^{ci-rep}.

Para diversificar la V_H CDR1-2 en un anticuerpo candidato específico de antígeno o un grupo de anticuerpos candidatos específicos de antígeno, el gen o los genes de anticuerpo Fab se clonan en primer lugar en el vector de presentación en levadura pTQ3 como en el Ejemplo 2 para producir pTQ3-Fab. Una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 se aísla a partir de la biblioteca de fagémido CJ mediante digestión de restricción con *Sfi*I y *Xba*I, pTQ3-Fab también se digiere con *Sfi*I y *Xba*I, y el fragmento endógeno de V_H CDR1-2 se reemplaza por una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2, dando como resultado el repertorio pTQ3-V_H CDR1-2^{ci-rep}. Después, este repertorio se transfiere a la cepa de levadura EBY100 para producir EBY100 pTQ3-V_H CDR1-2^{ci-rep}.

Será evidente para los especialistas en la técnica que el procedimiento de clonación se puede realizar de varias maneras diferentes, *por ejemplo* construyendo en primer lugar un repertorio de fragmentos V_H CDR1-2 y después clonando en la V_H CDR3 específica de antígeno o conjunto de V_H CDR3.

Se prepara un cultivo de EBY100 pTQ3-V_H CDR1-2^{ci-rep} y EBY100 pTQ3-LC^{ci-rep} como en el Ejemplo 2. El cultivo de levadura después se marca para presentación de LC y unión a antígeno, y se selecciona por afinidad mediante clasificación citométrica de flujo como en el Ejemplo 10. Después, los clones seleccionados se analizan para determinar su secuencia de ADN y su mejorar en afinidad como en el Ejemplo 10.

EJEMPLO 30: Maduración de la afinidad mediante redistribución combinatoria de fragmentos de genes usando apareamiento de levadura

Para demostrar que el apareamiento de levadura se puede usar para diversificación génica combinatoria y maduración de la afinidad de un anticuerpo candidato específico de antígeno o anticuerpos candidatos específicos de antígeno, se rediversifica una LC o grupo de LC seleccionadas, o se rediversifica un fragmento de V_H CDR1-2 de una HC seleccionada o grupo de HC. Los anticuerpos que comprenden la biblioteca de fagémidos CJ son susceptibles a un enfoque de este tipo. Tienen una LC asegurada por un sitio de restricción *Apa*L1 y *Ascl* único y una HC asegurada por un sitio de restricción *Sfi*I y *Not*I único. La HC también contiene un sitio de restricción *Xba*I interno y único entre la secuencia de CDR2 y CDR3. Ya que las LC y HC están presentes en célula de levadura de tipo de apareamiento opuesto, se usa apareamiento de levadura para unir LC específica de antígeno con una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 o HC específica de antígeno con una pluralidad de LC, eliminando de ese modo la necesidad de clonación basada en restricción para emparejar una LC con una HC.

En un método preferido para diversificar un anticuerpo candidato específico de antígeno o un grupo de anticuerpos candidatos específicos de antígeno, los genes de anticuerpo del componente HC se clonan en el vector de presentación en levadura pTQ5 como en el Ejemplo 13 para producir pTQ5-HCAg. Se prepara una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 mediante digestión de los fragmentos de HC a partir de la biblioteca de fagémidos CJ con

- enzimas de restricción *Sfi*l y *Xba*l. Esta pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 después se clona en ADN preparado a partir de pTQ5-HCAG, que se ha digerido con *Sfi*l y *Xba*l para retirar el fragmento de V_H CDR1-2 endógeno y para reemplazarlo con la pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2, reteniéndose la V_H-CDR3 específica de antígeno. Esto produce una biblioteca denominada pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3Ag), y se introduce en la cepa de levadura EBY100 para producir un repertorio EBY100 pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3Ag). Una pluralidad de LC se aísla a partir de una preparación de ADN de la biblioteca de fagémidos CJ mediante digestión de restricción con *Apa*L1 y *Asc*I. Esta pluralidad de LC se clona en pTQ6 para producir un repertorio pTQ6-LC^{rep} y sirve como un repertorio maestro para maduración de la afinidad de otros anticuerpos específicos para otras dianas. Después, este repertorio se transfiere a una cepa de levadura del tipo de apareamiento opuesto, BJ5457, para producir BJ5457 pTQ6-LC^{rep}.
- En un régimen de apareamiento, que permite la diversificación simultánea tanto de LC como del fragmento de gen de V_H CDR1-2, se preparan cultivos de EBY100 pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3Ag) y BJ5457 pTQ6-LC^{rep} como en el Ejemplo 22. Los dos repertorios se aparean entre sí (véase el Ejemplo 19) para producir un repertorio diploide EBY100 pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3Ag)/BJ5457 pTQ6-LC^{rep}. La expresión de anticuerpo Fab se induce (véase el Ejemplo 18), y el repertorio diploide se selecciona por afinidad como en el Ejemplo 20. Los clones seleccionados se analizan para afinidad mejorada como en el Ejemplo 23.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y detalles en la misma sin alejarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Dyax Corporation
- <120> VECTORES DE PRESENTACIÓN EUCARIOTAS MULTICATENARIOS Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> F62670PCEP
- <140> 02766425.9
- <141> 30-09-2002
- <150> US 60/327,320
- <151> 01-10-2001
- <160>7
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- <211> 206
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> poliligador de vector
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)...(206)
- <400> 1

ES 2 405 551 T3

```

atg cag tta ctt cgc tgt ttt tca ata ttt tct gtt att gct agc gtt 48
Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
 1          5          10
tta gca tac cca tac gac gtt cca gac tac gct agt gca cag gat ttc 96
Leu Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Ala Gln Asp Phe
          20          25          30
gtg caa tgc ggc gcg cca gga tcc gcc tga atg gtc tgc aga ccg tac 144
Val Gln Cys Gly Ala Pro Gly Ser Ala * Met Val Cys Arg Pro Tyr
          35          40
cga ccg aat tcg agt tac ctg agg tta att aac act gtt atc gtt taa 192
Arg Pro Asn Ser Ser Tyr Leu Arg Leu Ile Asn Thr Val Ile Val *
          50          55          60
acg ttc agg tgc aa 206
Thr Phe Arg Cys
          65

```

<210> 2

<211> 66

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> poliligador de vector

<400> 2

```

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
 1          5          10
Leu Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Ala Gln Asp Phe
          20          25          30
Val Gln Cys Gly Ala Pro Gly Ser Ala Met Val Cys Arg Pro Tyr Arg
          35          40
Pro Asn Ser Ser Tyr Leu Arg Leu Ile Asn Thr Val Ile Val Thr Phe
          50          55          60
Arg Cys
          65

```

10 <210> 3

<211> 119

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia vector

<220>

<221 > CDS

<222> (1)...(111)

<400> 3

ES 2 405 551 T3

```

gga ggc gga ggt tct ggg ggc gga gga tct ggt ggc gga ggt tct gcg 48
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15
gcc cag ccg gcc agt cct gat gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca 96
Ala Gln Pro Ala Ser Pro Asp Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
20 25 30
gaa gag gat ctg aat ttaattaa 119
Glu Glu Asp Leu Asn
35

```

<210> 4

<211> 37

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epitopo Tag

<400> 4

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Ser Pro Asp Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
20 25 30
Glu Glu Asp Leu Asn
35

```

10 <210> 5

<211> 1213

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia vector

<220>

<221 > CDS

<222> (816)...(1208)

<400> 5

```

caaaatcgac tttgttccca ctgtactttt agctcgtaca aaatacaata tacttttcat 60
ttctccgtaa acaacatggt ttcccatgta atatcctttt ctatttttcg ttccggtacc 120
aactttacac atactttata tagctattca cttctataca ctaaaaaact aagacaattt 180
taattttgct gcctgccata ttccaatttg ttataaattc ctataattta tcctattagt 240
agctaaaaaa agatgaatgt gaatcgaatc ctaagagaat tcacggatta gaagccgccg 300
agcgggtgac agccctccga aggaagactc tcctccgtgc gtcctcgtct tcaccggtcg 360
cgttcctgaa acgcagatgt gcctcgcgcc gcactgctcc gaacaataaa gattctacaa 420

```

20

ES 2 405 551 T3

```
tactagcttt tatggttatg aagaggaaaa attggcagta acctggcccc acaaaccttc 480
aatgaacga atcaaattaa caaccatagg atgataatgc gattagtttt ttagccttat 540
ttctggggta attaatacagc gaagcagatga tttttgatct attaacagat atataaatgc 600
aaaaactgca ttaaccactt taactaatac tttcaacatt ttcggtttgt attacttctt 660
attcaaagt aataaaagta tcaacaaaaa attgttaata tacctctata ctttaacgctc 720
aaggagaaaa aacccggatc ggactactag cagctgtaat acgactcact ataggggata 780
ttaagctaatt tctacttcat acattttcaa ttaag atg cag tta ctt cgc tgt 833
                               Met Gln Leu Leu Arg Cys
                               1                               5
```

```
ttt tca ata ttt tct gtt att gct tca gtt tta gca cag gaa ctg aca 881
Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val Leu Ala Gln Glu Leu Thr
                               10                               15                               20
```

```
act ata tgc gag caa atc ccc tca cca act tta gaa tcg acg ccg tac 929
Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr Leu Glu Ser Thr Pro Tyr
                               25                               30                               35
```

```
tct ttg tca acg act act att ttg gcc aac ggg aag gca atg caa gga 977
Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn Gly Lys Ala Met Gln Gly
                               40                               45                               50
```

```
gtt ttt gaa tat tac aaa tca gta acg ttt gtc agt aat tgc ggt tct 1025
Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe Val Ser Asn Cys Gly Ser
                               55                               60                               65                               70
```

```
cac ccc tca acg act agc aaa ggc agc ccc ata aac aca cag tat gtt 1073
His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro Ile Asn Thr Gln Tyr Val
                               75                               80                               85
```

```
ttt gga ggc gga ggt tct ggg ggc gga gga tct ggt ggc gga ggt tct 1121
Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
                               90                               95                               100
```

```
gcg gcc cag ccg gcc agt cct gat gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc 1169
Ala Ala Gln Pro Ala Ser Pro Asp Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile
                               105                               110                               115
```

```
tca gaa gag gat ctg aat tta att aac act gtt atc gtt taaac 1213
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Leu Ile Asn Thr Val Ile Val
                               120                               125                               130
```

<210> 6

<211> 126

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia vector

<220>

10 <221 > CDS

<222> (1)...(123)

<400> 6

ES 2 405 551 T3

```

atg cag tta ctt cgc tgt ttt tca ata ttt tct gtt att gct agc gtt 48
Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
 1 5 10 15
tta gca tac cca tac gac gtt cca gac tac gct agt gca cag gat ttc 96
Leu Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Ala Gln Asp Phe
 20 25 30
gtg caa tgc ggc gcg cca gga tcc atg taa 126
Val Gln Cys Gly Ala Pro Gly Ser Met
 35 40

```

<210> 7

<211> 131

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia vector

<400> 7

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para presentar una población heterogénea de polipéptidos multicatenarios biológicamente activos, comprendiendo cada polipéptido multicatenario dos o más cadenas polipeptídicas, sobre la superficie de células de levadura diploides, que comprende:

5 proporcionar células de levadura, comprendiendo cada célula de levadura:

(i) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una cadena de un polipéptido multicatenario biológicamente activo, estando el polipéptido enlazado a un anclaje de la superficie celular, y

10 (ii) uno o más polinucleótidos adicionales que codifican uno o más polipéptidos que comprenden la otra cadena o cadenas del polipéptido multicatenario, estando el uno o más polipéptidos enlazados a un anclaje de la superficie celular, en el que las células de levadura diploides son capaces de expresar y segregar las cadenas de los polipéptidos multicatenarios; y

15 cultivar las células de levadura en condiciones suficientes para permitir la expresión y asociación de las cadenas de los polipéptidos multicatenarios, en el que, para cada célula de levadura, el polipéptido multicatenario biológicamente activo está unido a la superficie de la célula de levadura mediante el anclaje de la superficie celular, y las cadenas del polipéptido multicatenario se asocian de tal manera que la actividad biológica del polipéptido multicatenario se muestra en la superficie de la célula de levadura,

en el que las células de levadura diploides cultivadas presentan colectivamente la población heterogénea de los polipéptidos multicatenarios biológicamente activos.

20 2. El método según la reivindicación 1, en el que las células de levadura diploides se preparan mediante las etapas de:

25 fusionar una primera célula de levadura haploide que comprende un polinucleótido que codifica una cadena del polipéptido multicatenario que está enlazado a un anclaje de la superficie celular con una segunda célula de levadura haploide que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una o más de las otras cadenas del polipéptido multicatenario en condiciones suficientes para permitir que las células se fusionen, produciendo de ese modo una célula de levadura diploide, en el que la primera célula de levadura haploide y la segunda célula de levadura haploide son de tipo de apareamiento opuesto, especialmente en el que la primera y segunda células de levadura haploides son células de *Saccharomyces cerevisiae*.

30 3. El método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que cada una de las células de levadura diploides comprende tres polinucleótidos que codifican tres cadenas que forman el polipéptido multicatenario.

4. El método según la reivindicación 1, en el que la población heterogénea de polipéptidos multicatenarios biológicamente activos comprende cada una al menos un dominio de cadena pesada de una inmunoglobulina y un dominio de cadena ligera de una inmunoglobulina.

35 5. El método según la reivindicación 1, en el que la población heterogénea de polipéptidos multicatenarios biológicamente activos comprende cada una cuatro cadenas, y una de ellas está enlazada a un anclaje de la superficie celular.

6. El método según la reivindicación 2, en el que la primera célula haploide comprende un polinucleótido que codifica un dominio de cadena pesada de una inmunoglobulina, y la segunda célula haploide comprende un polinucleótido que codifica un dominio de cadena ligera de una inmunoglobulina.

40 7. El método según la reivindicación 4 ó 6, en el que el dominio de cadena pesada incluye un VH y CH1.

8. El método según la reivindicación 4, 6 ó 9, en el que el dominio de cadena ligera incluye un VL y CL.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anclaje de la superficie celular es α -aglutinina, a-aglutinina, Aga1p, Aga2p o FLO1.

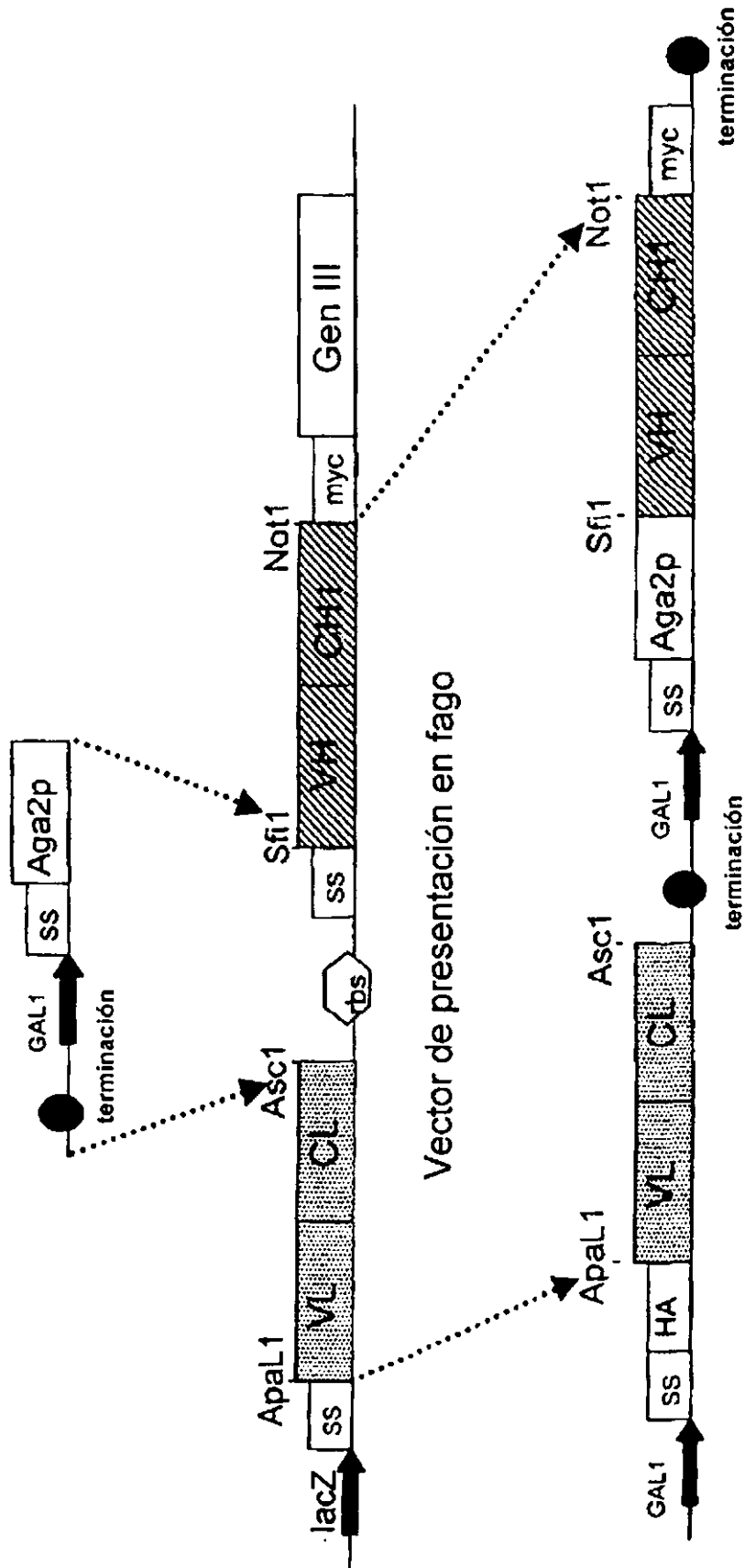
45 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células de levadura son *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Debaryomyces* y *Candida*, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* o *Yarrowia lipolytica*, en particular *Saccharomyces cerevisiae*.

11. Un método para detectar un polipéptido multicatenario biológicamente activo que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas a partir de una librería de polipéptidos multicatenarios, que comprende:

proporcionar una librería de células de levadura que presenta una población heterogénea de polipéptidos multicatenarios biológicamente activos sobre la superficie de células de levadura diploides mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores;

aislar células de levadura diploides que presentan la actividad biológica.

- 5 12. Un método para detectar y aislar uno o más polipéptidos multicatenarios que presentan una actividad biológica de interés, que comprende:
- proporcionar una pluralidad de células de levadura que presentan una población heterogénea de polipéptidos multicatenarios biológicamente activos sobre la superficie de células de levadura diploides mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
- 10 poner en contacto las células de levadura con una molécula de interés; y
- seleccionar y aislar células que muestran una interacción particular con la molécula de interés, particularmente
- 15 i) en el que se aísla una célula de levadura que presenta el polipéptido multicatenario que muestra la actividad biológica de interés, y, opcionalmente, se somete a al menos una ronda adicional de selección; o
- ii) que comprende además identificar la librería usando una identificación de presentación en fagos; o
- iii) en el que la actividad biológica de interés es una interacción entre el polipéptido multicatenario y otra especie molecular, y comprende una asociación no covalente entre la especie molecular, en particular en el que la interacción es transitoria o es una interacción covalente.
- 20 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se presentan sobre las superficies de las células de levadura al menos 10^7 polipéptidos multicatenarios biológicamente activos.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se presentan sobre la superficie de las células de levadura diploides al menos 10^4 polipéptidos multicatenarios, particularmente al menos 10^7 polipéptidos multicatenarios, especialmente al menos 10^8 polipéptidos multicatenarios.



Vector de presentación en levadura

FIG. 1

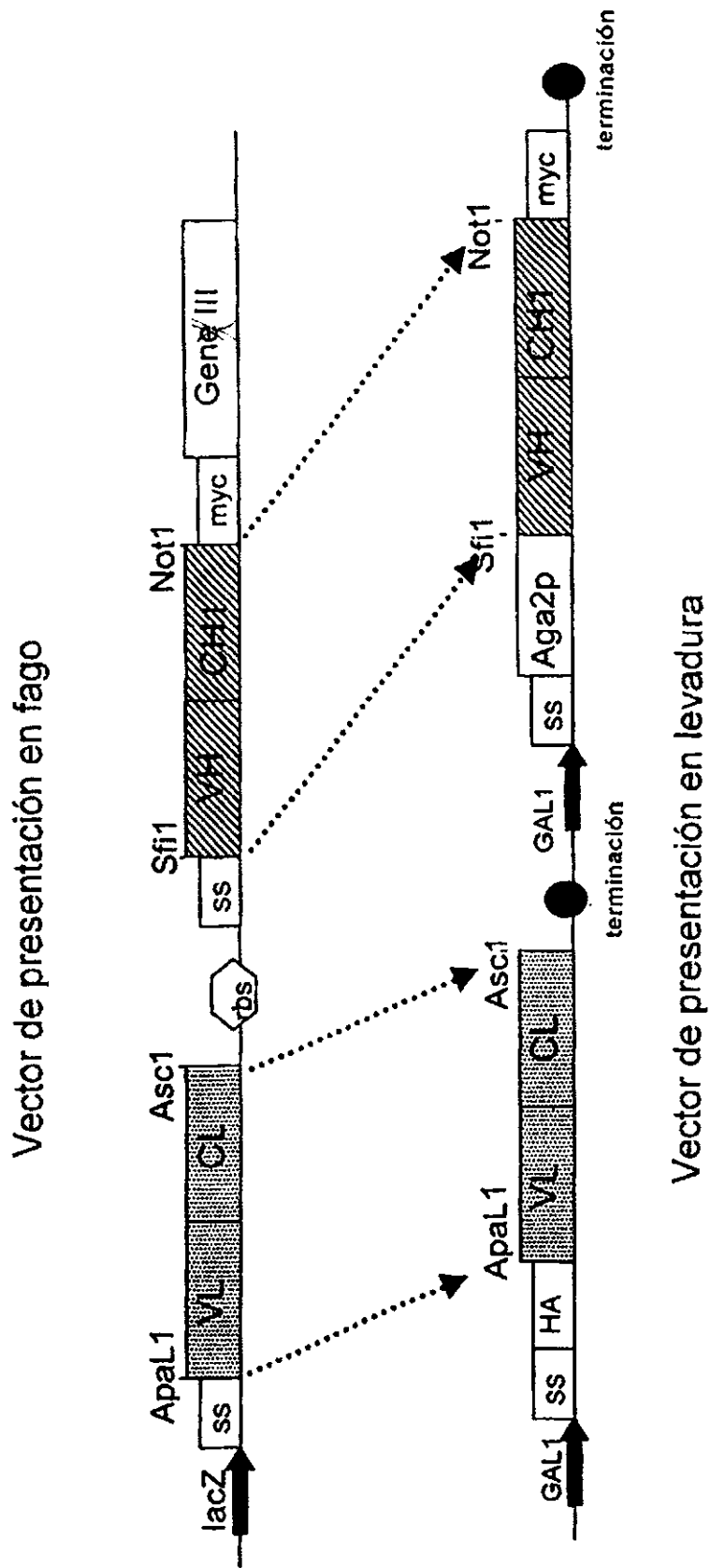


FIG. 2

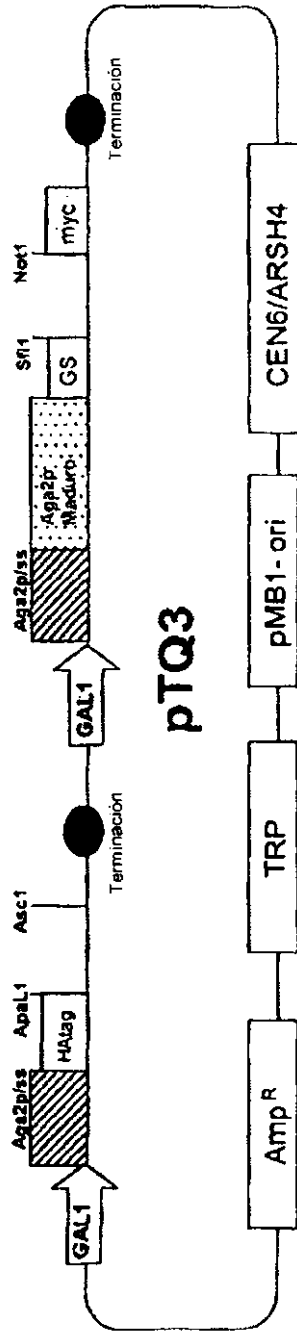


FIG. 3

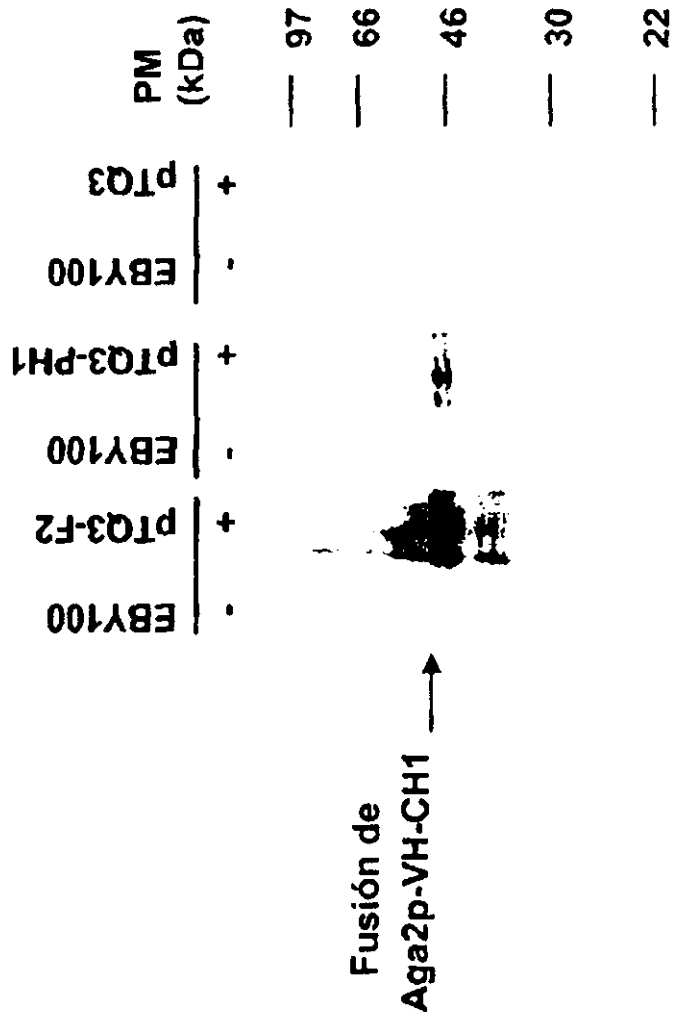


FIG. 4A

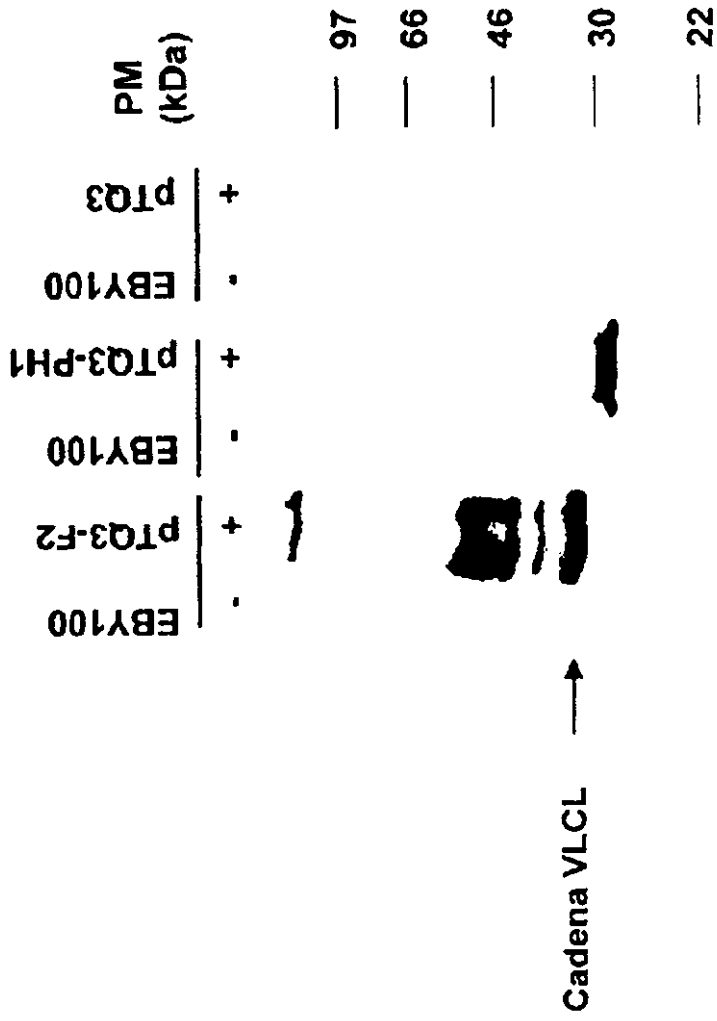


FIG. 4B

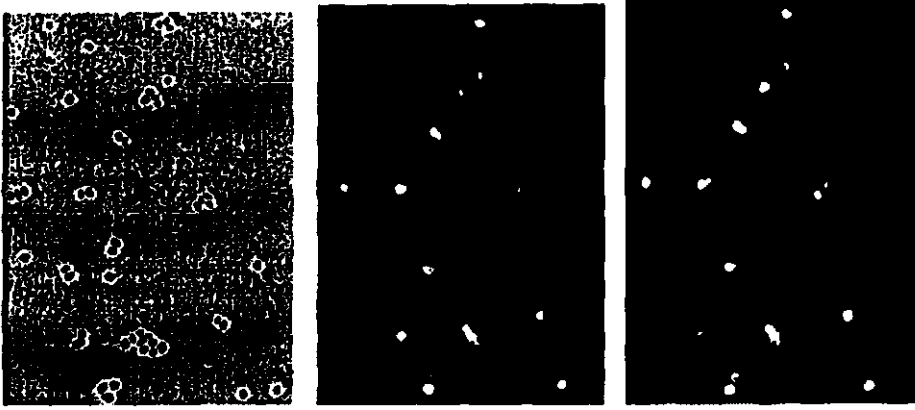


FIG. 4C

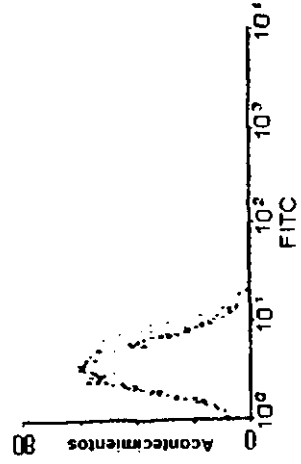
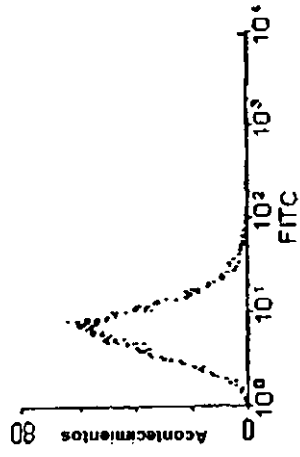
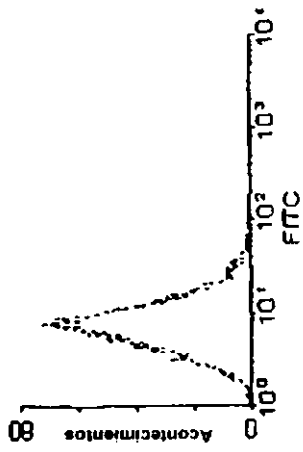
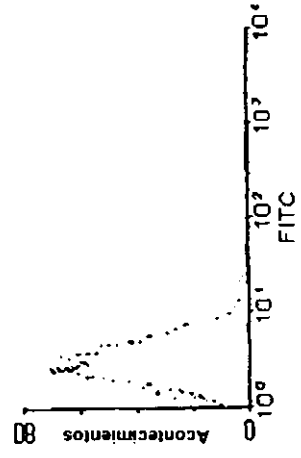
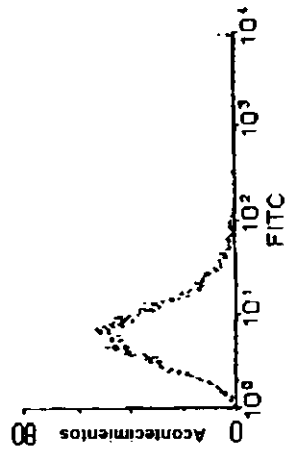
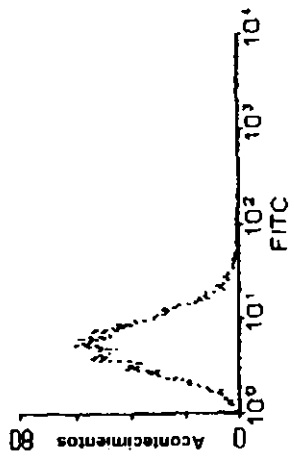


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

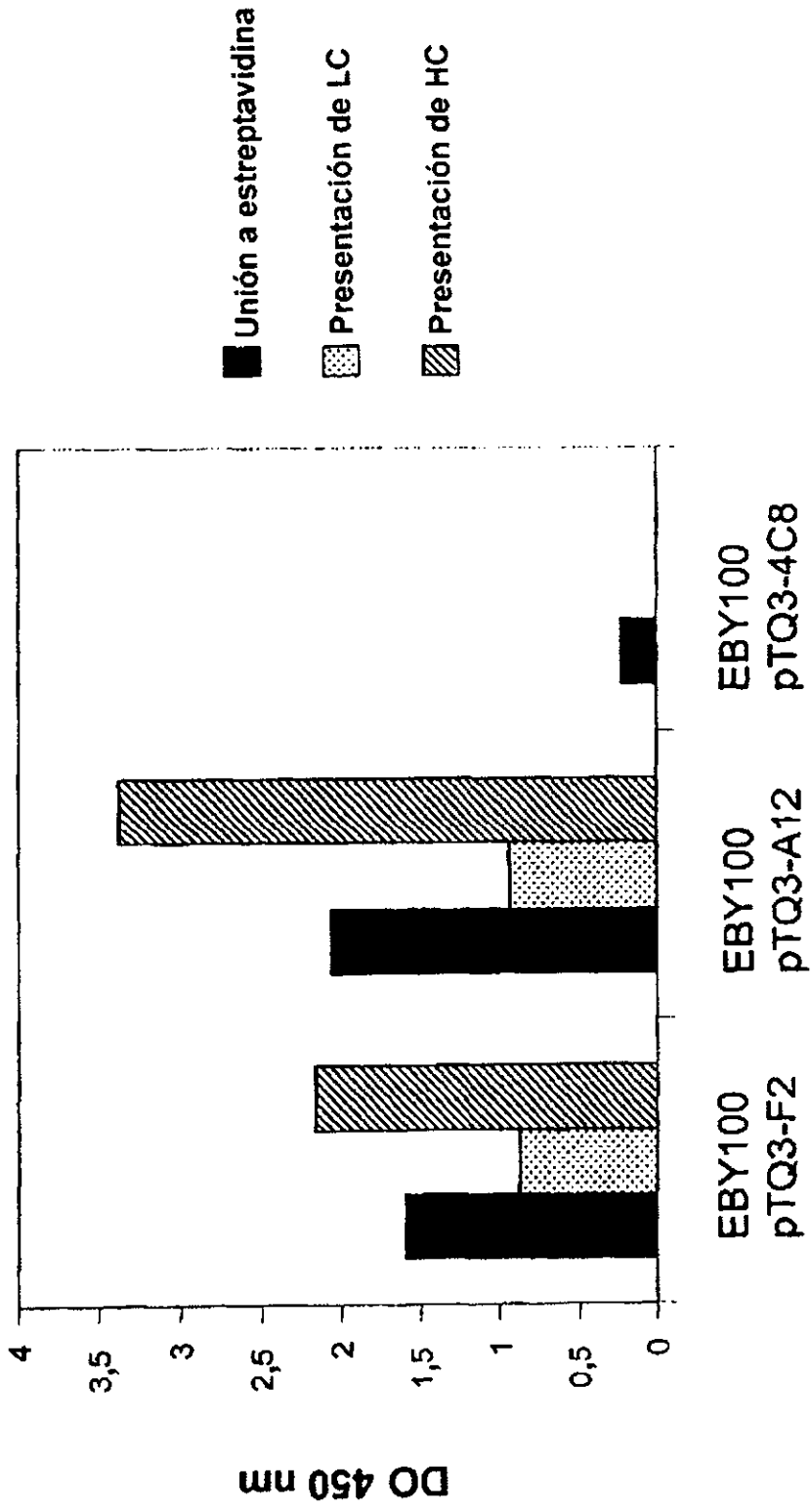


FIG. 6

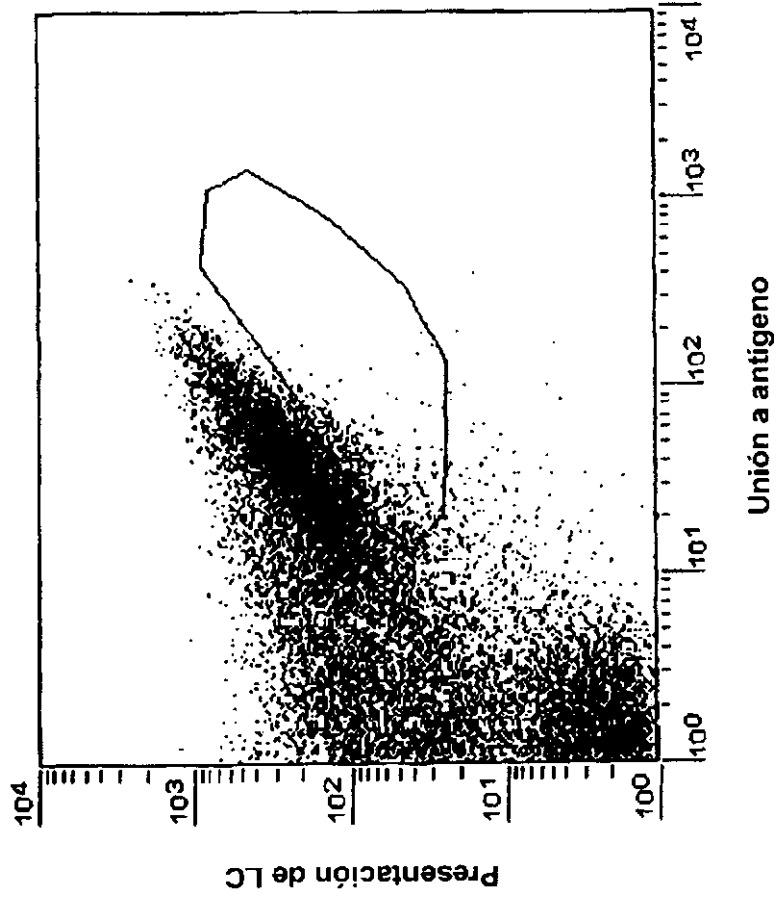


FIG. 7

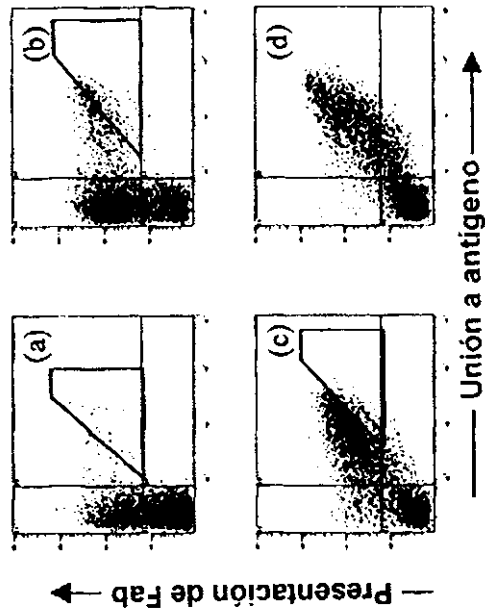


FIG. 8A

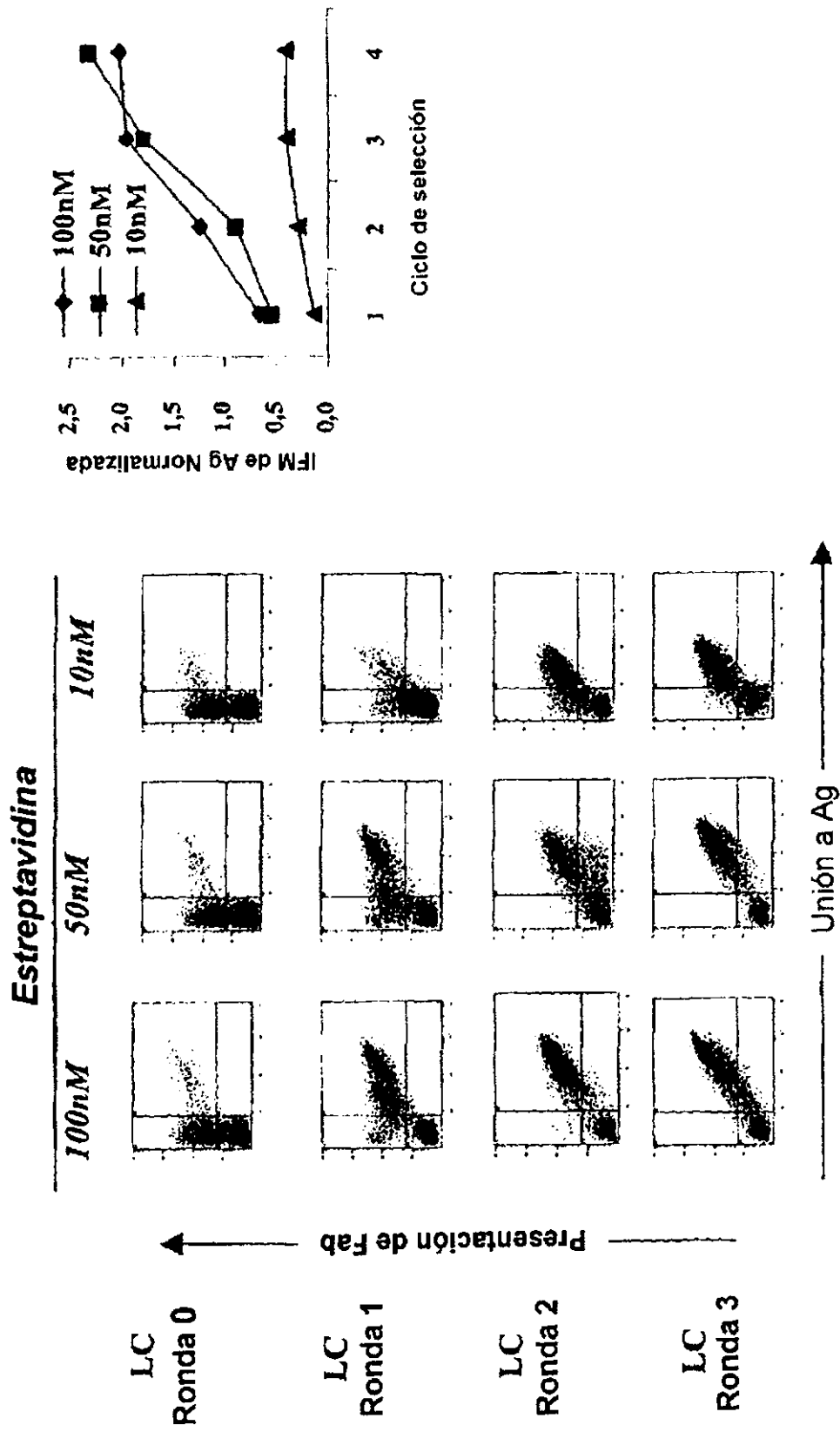


FIG. 8B

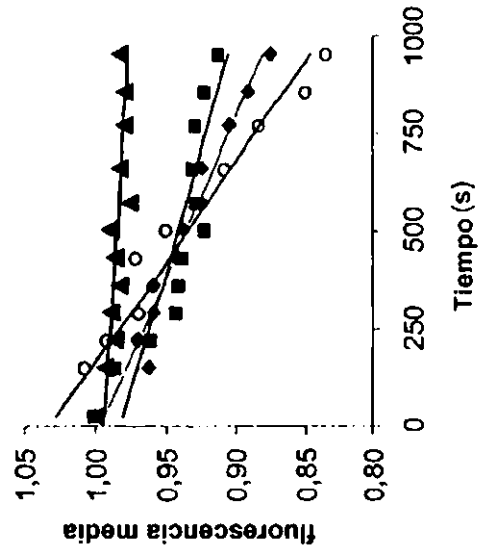


FIG. 8C

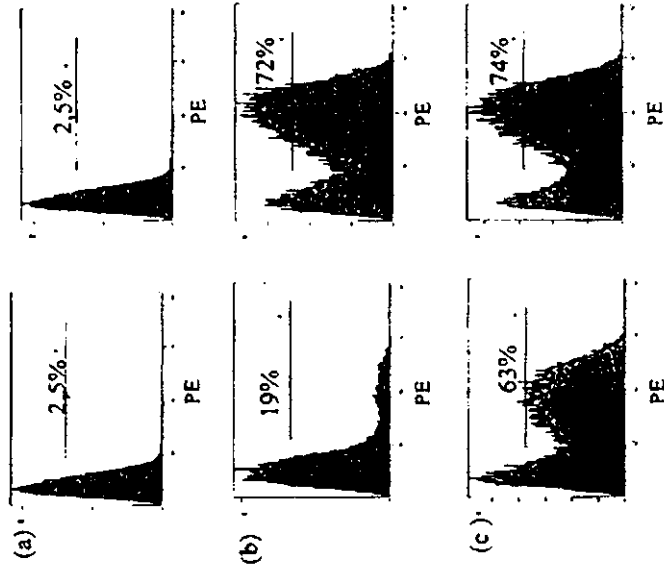


FIG. 8D

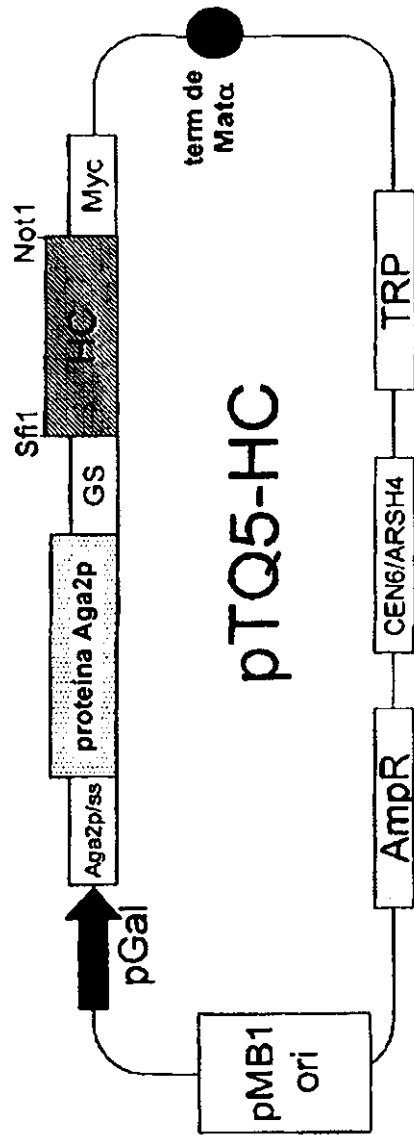


FIG. 9

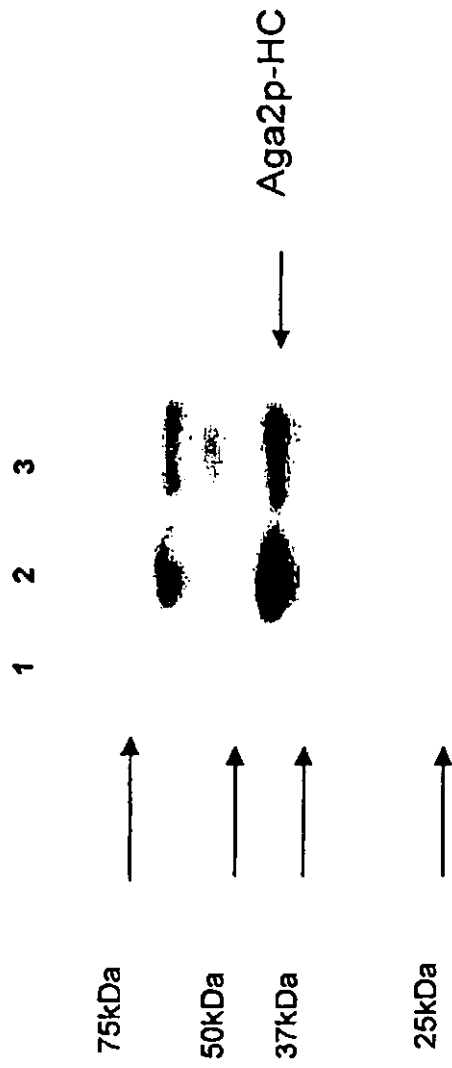


FIG. 10

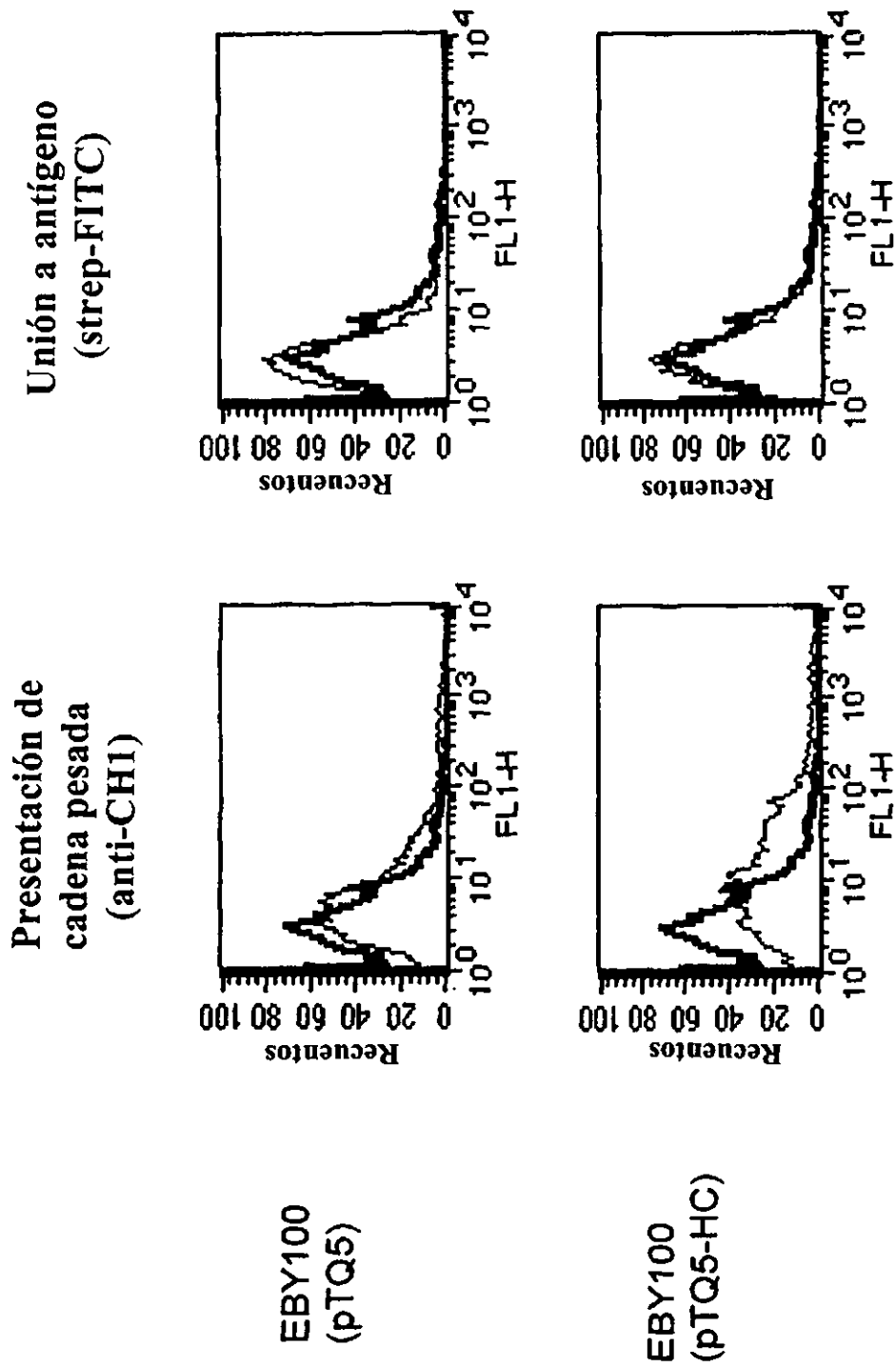


FIG. 11

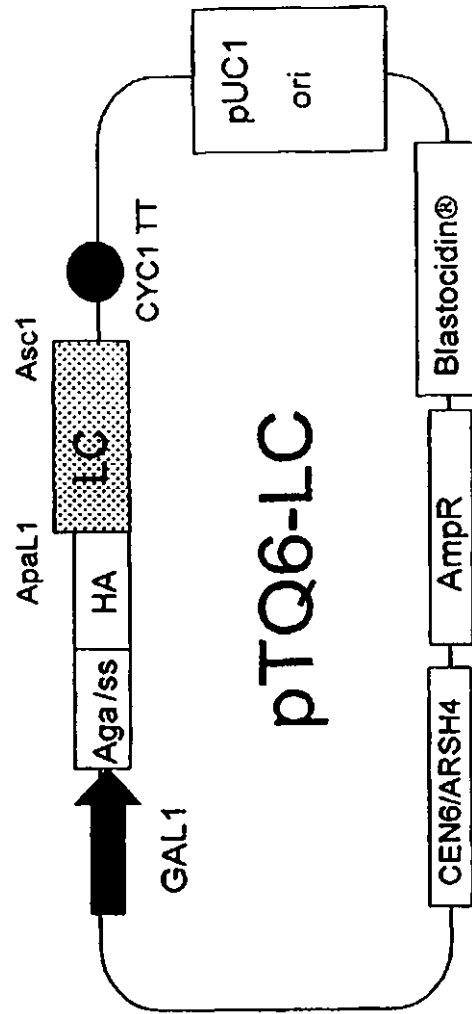


FIG. 12

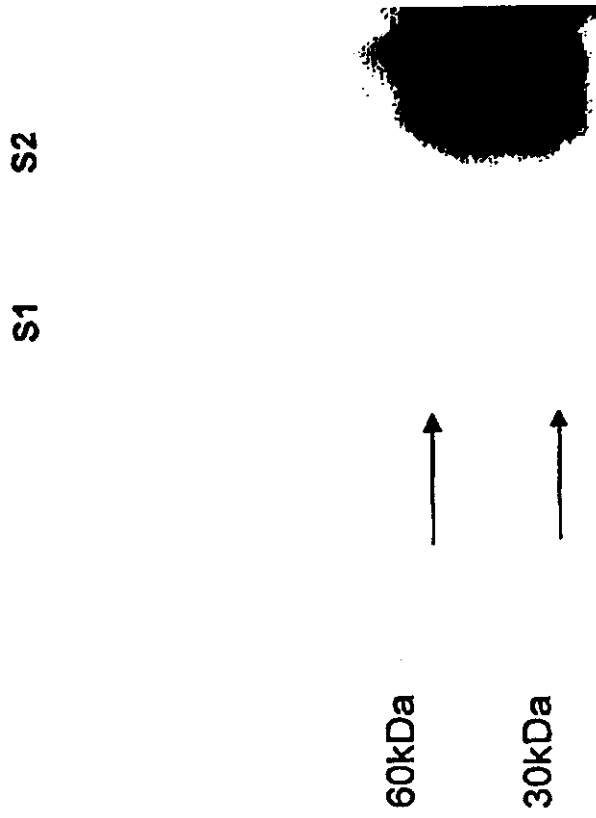


FIG. 13

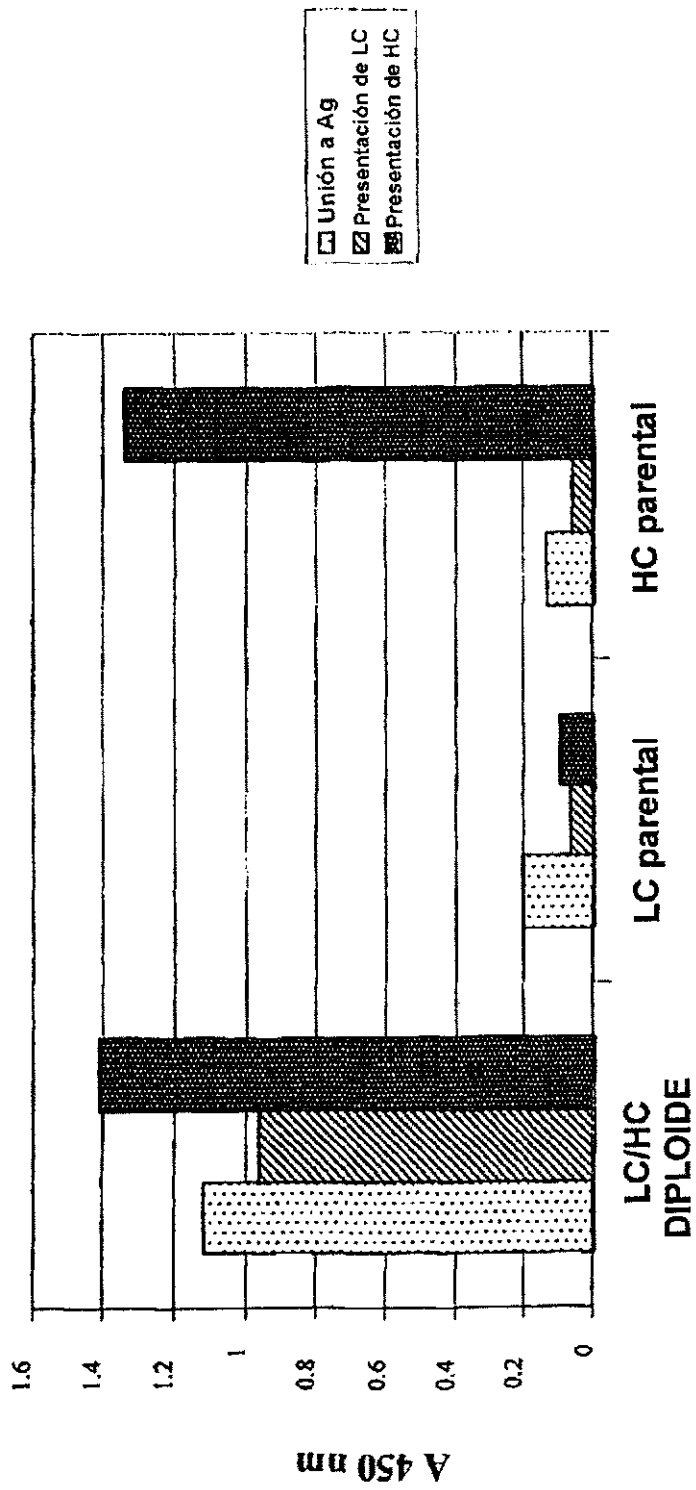
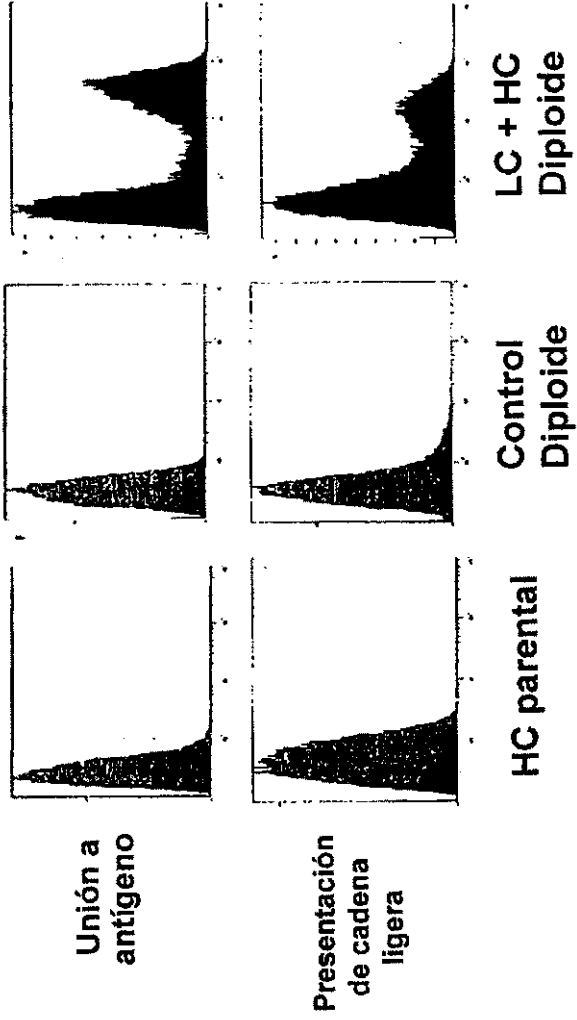


FIG. 14

FIG. 15A FIG. 15B FIG. 15C



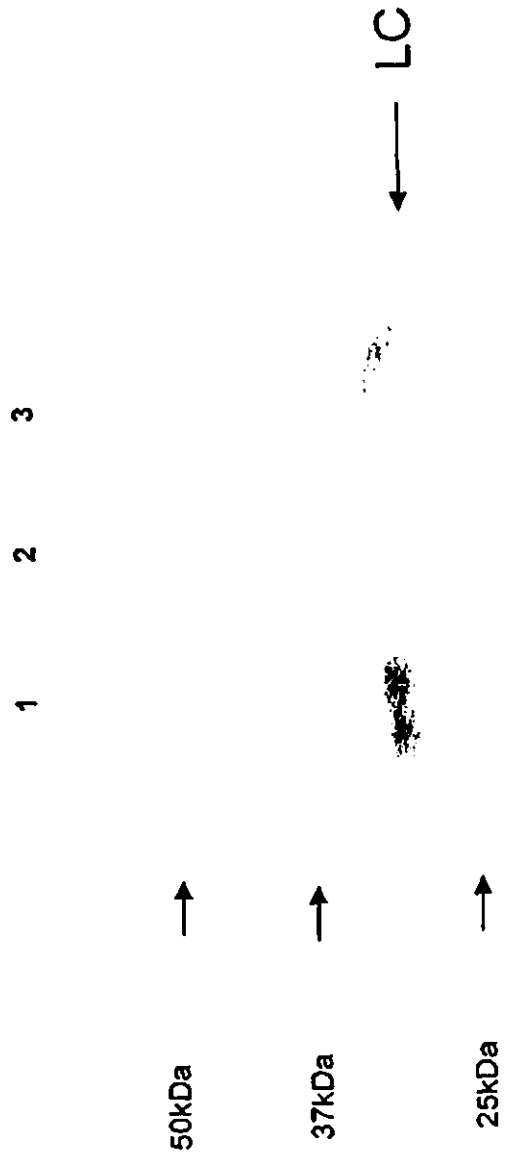


FIG. 16

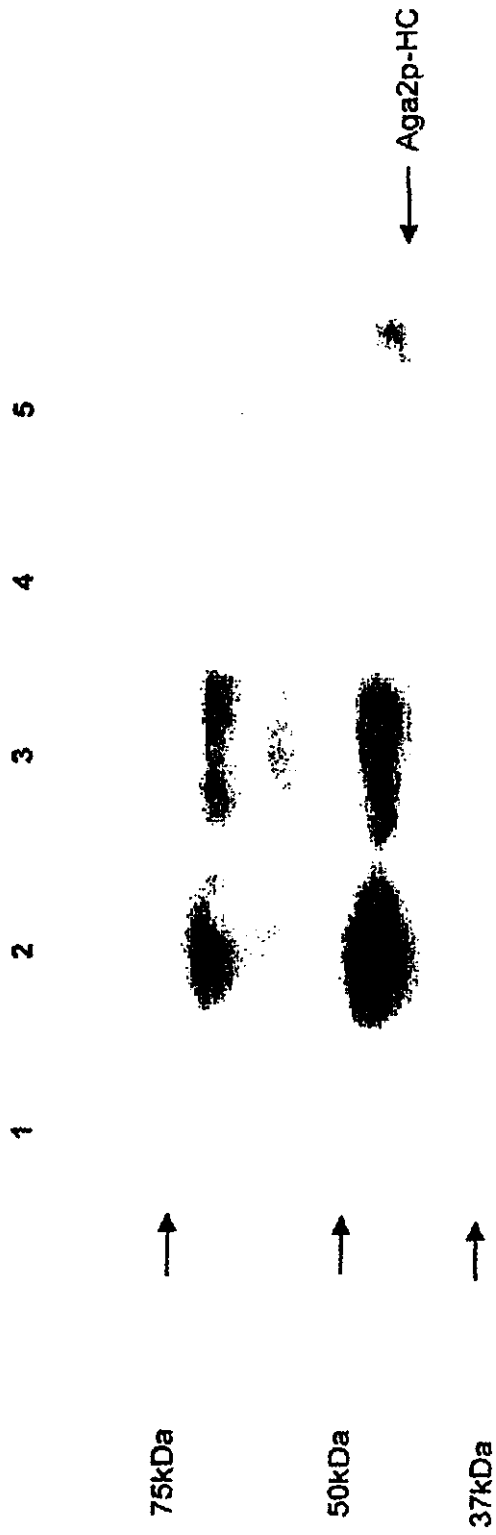
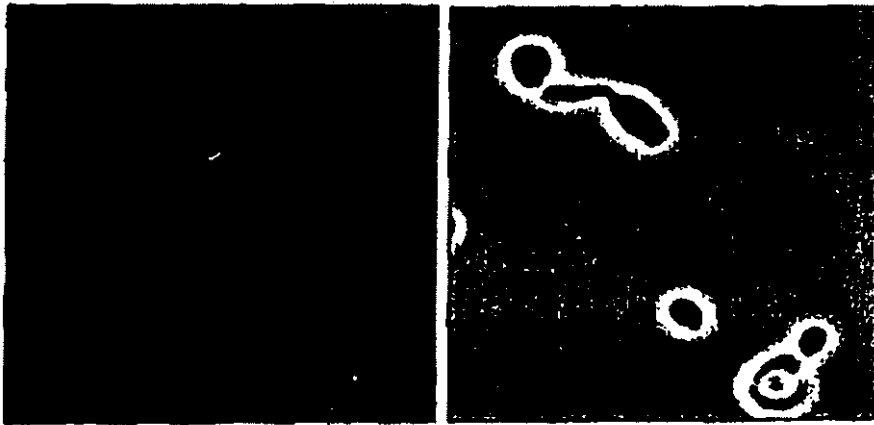


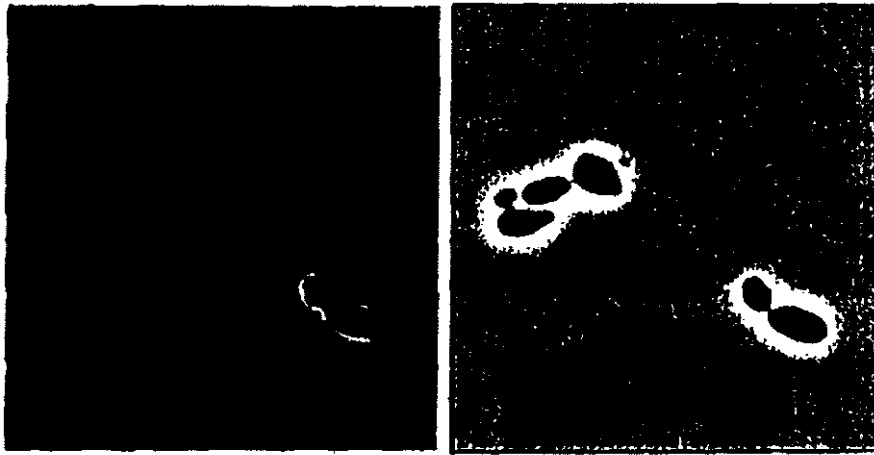
FIG. 17

FIG. 18A



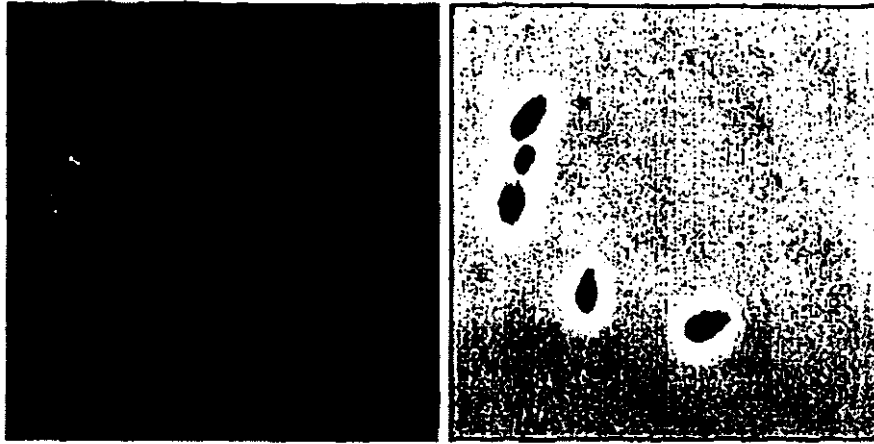
Presentación
de LC

FIG. 18B



Presentación
de HC

FIG. 18C



Unión a antígeno