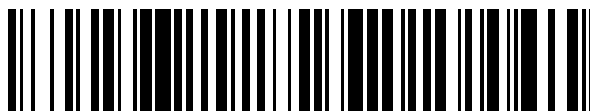


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 579**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C40B 40/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09774904 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2379718**

54 Título: **Sistemas de despliegue de levaduras**

30 Prioridad:

**16.12.2008 US 122910 P**

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

**02.07.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LOEW, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 410 579 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

Sistemas de despliegue de levaduras

Campo

5 La presente invención se refiere al campo de bibliotecas de despliegue de proteína y tamizaje de bibliotecas. De manera más específica, la presente invención se refiere a la producción de proteínas para despliegue sobre superficies de células.

Antecedentes de la invención

10 Los dominios de enlazamiento de proteína se pueden predecir a partir de los datos de la secuencia, sin embargo, el rediseño de proteínas con afinidades de enlazamiento mejoradas o alteradas con frecuencia requiere del análisis de una cantidad de variantes de la proteína rediseñada. Actualmente el mejor método para obtener proteínas con las afinidades de enlazamiento deseadas es generar y tamizar una biblioteca de proteínas que incluya a tales variantes que puedan incluir proteínas rediseñadas racionalmente, proteínas alteradas en forma aleatoria, o una combinación de las mismas. Se han construido y tamizado en forma satisfactoria bibliotecas de muchos tipos de proteína, tales como inmunoglobulinas y proteínas de andamiaje y receptores o ligandos de receptores con respecto a la afinidad de enlazamiento.

15 Existen muchos métodos para tamizar bibliotecas, pero uno de los métodos más comunes es el método de despliegue en fagos, el cual comprende la fusión de una biblioteca de proteína a las proteínas de recubrimiento de un fago filamentosos (por ejemplo, Huse et al., '89; Clackson et al., '91; Marks et al., '92). Las fusiones se hacen más comúnmente con una proteína menor de recubrimiento, llamada la proteína del gen III (pIII), la cual está presente en tres a cinco copias de la punta del fago. La biblioteca fusionada se despliega luego sobre la superficie de la partícula viral. La biblioteca de despliegue en fagos puede ser luego tamizada contra una proteína objetivo inmovilizada. Sin embargo, un inconveniente importante de este método es que las proteínas objetivo que se enlazan a la biblioteca con muy alta afinidad no siempre son identificadas debido a que las condiciones requeridas para eluir la fase enlazada usualmente desnaturalizan la partícula de fago de modo tal que se hace imposible identificar la proteína de interés. Otro inconveniente de las bibliotecas de despliegue en fago es el requerimiento de que la proteína objetivo se inmovilice sobre una superficie sólida, lo cual puede conducir a dificultades para determinar la afinidad real de una proteína objetivo para la proteína de despliegue en fago. Además, algunas proteínas de interés requieren de modificaciones posteriores a la traducción, tales como glucosilación, metilación, o formación de puentes de disulfuro, que no se pueden lograr cuando se expresan en una partícula de fago.

20 Un método alternativo para seleccionar bibliotecas de proteína es desplegar la biblioteca sobre la superficie de células bacterianas. Este método resuelve muchos de los inconvenientes asociados con el despliegue en fago, pero tiene sus propios problemas. Un problema con el despliegue en bacterias es que la cápsula bacteriana puede causar impedimento estérico a las proteínas desplegadas sobre la superficie de la bacteria. Además, las bacterias no contienen la maquinaria para plegar de manera adecuada las proteínas eucariotas, de modo que la proteína de interés no siempre puede ser expresada dentro de la bacteria. En forma similar al problema en el fago, las bacterias no pueden proporcionar modificaciones posteriores a la traducción, tales como la formación de puentes de disulfuro, con una proteína eucariota.

25 Wittrup et al. (WO9936569) han desarrollado un método para una biblioteca que se despliega en célula de levadura. Este es un sistema de dos componentes, en donde el primer componente implica la expresión de una subunidad de la proteína de adhesión de apareamiento de levadura, aglutinina, la cual se ancla a la pared de la célula de levadura. El segundo componente implica la expresión de una biblioteca de proteína fusionada a una segunda subunidad de la proteína de aglutinina que forma puentes de disulfuro de alta afinidad con la primera subunidad de aglutinina. La biblioteca de proteína fusionada a la aglutinina es desplegada por lo tanto sobre la superficie de la célula. La biblioteca puede entonces ser seleccionada. Este método permite el plegamiento apropiado y la modificación posterior a la traducción de las proteínas eucariotas. La solicitud de patente WO2007046825 divulga métodos para detectar antígenos solubles usando células de detección que expresan un Receptor I gamma de Fc y una molécula llamada aequorina, que emite un fotón en respuesta a mayores concentraciones de calcio en la célula. El entrelazamiento de los receptores enlazados al anticuerpo por medio de un antígeno específico sobre la célula de detección resulta en un incremento en la concentración intracelular de calcio y por lo tanto las moléculas de aequorina emiten protones en respuesta al incremento en la concentración de calcio. Regis Cebe et al., divulgan un procedimiento de selección *in vitro* para fagos no infecciosos que despliegan un ligando capaz de interactuar con una molécula objetivo biotinilada. El dominio de estreptavidina de un adaptador modificado por ingeniería genética sirve como enlace entre una molécula objetivo biotinilada y el fago no infeccioso que carece de una proteína de recubrimiento del gen III funcional pero despliega en vez de eso un ligando de interacción (Regis et al., Size of the ligand complex between the N-terminal domain of the gene III coat protein and the noninfectious phage strongly influences the usefulness of in vitro selective infective phage technology, Biochemical Journal, volumen: 352, páginas: 841 - 849).

30 Rakestraw et al. (PCT/US2008/003978) han desarrollado un sistema de tres componentes para desplegar una

5 biblioteca de proteína sobre la superficie de células de levadura. El primer componente implica la expresión de una biblioteca de proteína fusionada a un péptido de enlazamiento de biotina, el segundo componente implica la modificación de la pared de la célula de levadura para expresar biotina, y el tercer componente implica el enlazamiento de avidina a la biotina expresada sobre la superficie de la célula. La biblioteca de proteína fusionada es luego biotinilada y secretada desde la célula de levadura y se enlaza a la avidina sobre la superficie de la célula de levadura, desplegando por lo tanto la biblioteca de proteína sobre la superficie de la célula de levadura. Un inconveniente potencial de este sistema es que la avidina no enlaza específicamente toda la biotina. Otro inconveniente potencial es que la avidina contiene cuatro sitios de enlazamiento, los cuales pueden ocasionar impedimento estérico evitando de esta manera que la biblioteca de proteína biotinilada se enlace con la avidina enlazada a la superficie de la célula. De manera similar, la molécula de avidina se puede enlazar a la biblioteca de proteína biotinilada antes de enlazarse a la pared de célula de levadura biotinilada, impidiendo así el enlazamiento de la avidina con la pared de la célula de levadura. Adicionalmente, este método tiene la complicación adicional de tener que biotinilar la biblioteca de proteína dentro de la célula de levadura. Esta etapa adicional necesaria requiere la modificación adicional de la célula de levadura. Está bien establecido que mientras más modificaciones se hagan a un sistema biológico, menos probable será que dicho sistema se comporte como se diseñó. Además, debido a que la avidina/estreptavidina es multivalente, se debe tener cuidado de no entrelazar las células biotiniladas. Por último, la biotina/estreptavidina y biotina/avidina se utilizan en una cantidad de kits para marcación comercialmente disponibles. Dichos kits podrían ser difíciles de usar en tal sistema de despliegue de biotina/avidina.

10 El estado del arte carece de un sistema sencillo y eficiente, capaz de enlazarse específicamente a una biblioteca de proteína secretada utilizando una molécula adaptadora que se una a la biblioteca de proteína y a la superficie de una célula eucariota a través de porciones diferentes de enlazamiento.

#### Resumen de la invención

25 La presente invención satisface esta necesidad proporcionando métodos y composiciones como los divulgados a través de toda la memoria descriptiva. Un aspecto incluye una biblioteca de células huésped con una molécula de la superficie de la célula unida a la superficie de la célula, una molécula adaptadora que comprende un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento, y una molécula de despliegue que comprende un polipéptido modificado en el que el primer sitio de enlazamiento se enlaza específicamente con la molécula de la superficie de la célula y no se puede enlazar con la molécula de despliegue, el segundo sitio de enlazamiento se enlaza específicamente con la molécula de despliegue y no se puede enlazar con la molécula de la superficie de la célula, y la molécula adaptadora no es un componente del polipéptido modificado en donde cada célula huésped incluye un diferente péptido modificado. En ciertas realizaciones, la célula huésped tiene una pluralidad de moléculas de despliegue. En otras realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones precedentes, la molécula de la superficie de la célula huésped se puede enlazar covalentemente con el primer sitio de enlazamiento. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de la superficie de la célula huésped puede incluir una primera aglutinina que puede ser Aga1p y en donde el primer sitio de enlazamiento comprende una segunda aglutinina que es Aga2p. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el segundo sitio de unión puede estar ligado covalentemente a la molécula de despliegue. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de la superficie de la célula huésped se puede unir a la membrana de la célula a través de un ancla de GPI. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el segundo sitio de enlazamiento se puede enlazar covalentemente con la molécula de despliegue. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el segundo sitio de enlazamiento incluye un dominio de InaD el cual puede tener la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de despliegue incluye un ligando de NorpA que puede estar en el terminal C el cual puede tener la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes excepto en donde el segundo sitio de enlazamiento incluye un dominio PDZ o donde la molécula de despliegue comprende un ligando de NorpA, la molécula de despliegue incluye un dominio PDZ que puede ser el dominio PDZ de InaD que puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes excepto en donde el segundo sitio de enlazamiento incluye un dominio PDZ o donde la molécula de despliegue incluye un ligando de NorpA, el segundo sitio de enlazamiento incluye un ligando de NorpA que puede estar en el terminal C el cual puede tener la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el polipéptido modificado puede ser una proteína de andamiaje, una proteína de transducción de señal, un anticuerpo, una inmunoglobulina, una inmunoadhesina, un receptor, un ligando, una oncoproteína, un factor de transcripción, o una enzima. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de despliegue puede ser un polipéptido de fibronectina el cual puede incluir un polipéptido F10. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de despliegue incluye un péptido de señal de secreción que puede ser una secuencia de señal de secreción de MFalfa, una glucoamilasa, una secuencia de señal de secreción de Aga2, una secuencia de señal de secreción de Flo1p, una secuencia de señal de secreción de invertasa, o una secuencia de señal de secreción de fosfatasa ácida. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el péptido de señal de secreción puede ser un péptido líder híbrido de MFalfa/HSA. En

5 otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la expresión de la molécula de despliegue está bajo el control de un primer promotor inducible el cual puede ser un promotor AOX 1, un promotor Cup 1, o un promotor Gal. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la expresión de la molécula adaptadora está bajo el control de un segundo promotor inducible el cual puede ser un promotor AOX 1, un promotor Cup 1, o un promotor Gal. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la célula huésped puede ser una célula de levadura la cual puede ser de *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Incluso otro aspecto incluye métodos para desplegar un polipéptido modificado el cual incluyen (a) proveer una célula huésped que comprende una molécula de la superficie de la célula unida a la superficie de la célula y un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido de despliegue que comprende un polipéptido modificado, (b) poner en contacto la célula huésped con una molécula adaptadora que comprende un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento bajo condiciones en las cuales el primer sitio de enlazamiento se enlaza a la molécula de la superficie de la célula, y después (c) incubar la célula huésped bajo condiciones en las cuales la célula huésped exporta el polipéptido de despliegue fuera de la célula huésped bajo condiciones en las cuales el segundo sitio de enlazamiento se enlaza con el polipéptido de despliegue, en donde el primer sitio de enlazamiento se enlaza específicamente con la molécula de la superficie de la célula y no se puede enlazar a la molécula de despliegue, el segundo sitio de enlazamiento se enlaza específicamente al polipéptido de despliegue y no se puede enlazar a la molécula de la superficie de la célula, y la molécula adaptadora no es un componente del polipéptido modificado. En otras realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones precedentes, la molécula de la superficie de la célula huésped puede estar ligada covalentemente al primer sitio de enlazamiento. En otras realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones precedentes, la molécula de la superficie de la célula huésped puede estar ligada covalentemente al primer sitio de enlazamiento a través de un puente de disulfuro. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de la superficie de la célula huésped puede incluir una primera aglutinina la cual puede ser Aga1p. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de la superficie de la célula huésped puede estar unida a la membrana celular mediante un ancla de GPI. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, en las cuales el primer sitio de enlazamiento comprende una segunda aglutinina que puede ser Aga2p. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el segundo sitio de enlazamiento puede estar ligado covalentemente a la molécula de despliegue. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el segundo sitio de enlazamiento puede estar ligado covalentemente a la molécula de despliegue a través de puentes de disulfuro. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el segundo sitio de enlazamiento incluye un dominio PDZ de InaD el cual puede tener la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de despliegue incluye un ligando de NorpA que puede estar en el terminal C el cual puede tener la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes excepto en casos en los que el segundo sitio de enlazamiento incluya un dominio PDZ o en los casos en los que la molécula de despliegue comprenda un ligando de NorpA, la molécula de despliegue incluye un dominio PDZ el cual puede ser el dominio PDZ de InaD que puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes excepto en casos en los que el segundo sitio de enlazamiento incluya un dominio PDZ o en los casos en los que la molécula de despliegue comprenda un ligando de NorpA, el segundo sitio de enlazamiento incluye un ligando de NorpA que puede estar en el terminal C el cual puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, en las cuales el polipéptido modificado puede ser una proteína de andamiaje, una proteína de transducción de señal, un anticuerpo, una inmunoglobulina, una inmunoadhesina, un receptor, un ligando, una oncoproteína, un factor de transcripción, o una enzima. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de despliegue puede ser un polipéptido de fibronectina el cual puede incluir un polipéptido F10. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la molécula de despliegue incluye un péptido de señal de secreción que puede ser una secuencia de señal de secreción MFalfa, una glucoamilasa, una secuencia de señal de secreción de Aga2, una secuencia de señal de secreción de Flo1p, una secuencia de señal de secreción de invertasa, o una secuencia de señal de secreción de fosfatasa ácida. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el péptido de señal de secreción puede ser un péptido líder híbrido de MFalfa/HSA. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la expresión de la molécula de despliegue está bajo el control de un primer promotor inducible el cual puede ser un promotor AOX 1, un promotor Cup 1, o un promotor Gal. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la expresión de la molécula adaptadora está bajo el control de un segundo promotor inducible el cual puede ser un promotor AOX 1, un promotor Cup 1, o un promotor Gal. En otras realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, la célula huésped puede ser una célula de levadura la cual puede ser de *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*.

Incluso otro aspecto incluye métodos para generar una biblioteca de despliegue de célula huésped que incluye la introducción en una pluralidad de células huésped una biblioteca de despliegue de los primeros ácidos nucleicos que

- codifican cada uno un polipéptido de despliegue que comprende un polipéptido modificado, en el cual por lo menos dos de los primeros ácidos nucleicos introducidos codifican diferentes polipéptidos modificados, en los cuales cada célula huésped comprende un segundo ácido nucleico el cual codifica un polipéptido de la superficie de la célula y un tercer ácido nucleico el cual codifica una molécula adaptadora que comprende un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento, en donde el primer sitio de enlazamiento se enlaza a la molécula de la superficie de la célula pero no al polipéptido de despliegue, el segundo sitio de enlazamiento se enlaza al polipéptido de despliegue pero no a la molécula de la superficie de la célula, y la molécula adaptadora no es un componente del polipéptido modificado. Este aspecto se puede combinar con cualquiera de las realizaciones de los aspectos precedentes.
- 5
- 10 Lo anterior son ejemplos no limitantes de la presente invención. Los aspectos adicionales y realizaciones se pueden encontrar a través de toda la memoria descriptiva.
- Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 muestra un esquema del sistema de tres componentes que incluye la molécula de la superficie de la célula, la molécula adaptadora que incluye al primero y segundo sitios de enlazamiento y la molécula de despliegue con el compañero de enlazamiento para el segundo sitio de enlazamiento (un polipéptido de enlazamiento en esta realización) y un polipéptido modificado como la molécula que está siendo desplegada. En esta realización, la célula huésped es una célula de levadura.
- 15
- La Figura 2 muestra el vector pPIC3.5 AGA1 para expresión en levadura de la Aga1p como la molécula de la superficie de la célula.
- 20 La Figura 3 muestra el vector pPIC6 A AGA2-InaD para expresión en levadura del polipéptido de fusión Aga2p-InaD como la molécula adaptadora.
- La Figura 4 muestra el vector pPICHOLI-1 MFalfa1HsaFn10-NorpA para expresión en levadura del polipéptido de fusión MFalfa1Hsa-Fn10-NorpA como la molécula de despliegue en la cual el NorpA es el compañero de enlazamiento del segundo sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora (es decir, InaD) y el dominio F10 de fibronectina es el polipéptido modificado.
- 25
- La Figura 5 muestra el vector pPICHOLI-C MFalfa1HsaFn10-NorpA para expresión en levadura del polipéptido de fusión MFalfa1Hsa-Fn10-NorpA como la molécula de despliegue en la cual el NorpA es el compañero de unión del segundo sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora (es decir, InaD) y el dominio F10 de fibronectina es el polipéptido modificado.
- 30 La Figura 6 muestra el vector pYD NBC1 Aga2-InaD para expresión en levadura del polipéptido de fusión Aga2p-InaD como la molécula adaptadora.
- La Figura 7 muestra al vector pYS HSA MFalfa1 Fn10 NorpA para expresión en levadura del polipéptido de fusión MFalfa1HSA-Fn10-NorpA como la molécula de despliegue en la cual el NorpA es el compañero de enlazamiento del segundo sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora (es decir, InaD) y el dominio F10 de fibronectina es el polipéptido modificado.
- 35
- La Figura 8 muestra el vector pYS MFalfa1 HSA NorpA para expresión en levadura del polipéptido de fusión MFalfa1HSA- -NorpA como la molécula de despliegue en la cual el NorpA es el compañero de enlazamiento del segundo sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora (es decir, InaD) y el HSA es el polipéptido desplegado.
- 40 Las Figuras 9A-E son gráficas de análisis FACS que muestran la expresión de la superficie de la proteína de células de levadura que expresan ya sea fibronectina (pYS6/CT HSA MFalfa1 Fn10 NorpA) o HSA (pYS6/CT MFalfa1-HSA-NorpA) en la cual las células de levadura se tiñen con anticuerpo anti-myc y anticuerpo anti-ratón secundario marcado con APC. La Figura 9A es el control con células de levadura no teñidas; la Figura 9B son células de levadura no inducidas que expresan fibronectina; la Figura 9C son células de levadura inducidas que expresan fibronectina que muestran un desplazamiento en la curva; la Figura 9D son células de levadura no inducidas que expresan HSA; y la Figura 9E son células de levadura inducidas que expresan HSA que muestra un desplazamiento en la curva.
- 45
- Las Figuras 10A-E son imágenes del análisis FMAT de células de levadura que expresan ya sea fibronectina (pYS6/CT HSA MFalfa1 Fn10 NorpA) o HSA (pYS6/CT HSA-NorpA) en las cuales las células de levadura están teñidas con anticuerpo monoclonal de ratón anti-myc y anticuerpo anti-ratón secundario marcado con APC y sometidas a fluorescencia confocal FMAT. La Figura 10A es el control con células de levadura no teñidas; la Figura 10B son células de levadura no inducidas que expresan fibronectina; la Figura 10C son células de levadura inducidas que expresan fibronectina que aparecen como manchas blancas; la Figura 10D son células de levadura no inducidas que expresan HSA; y la Figura 10E son células de levadura inducidas que expresan HSA que aparecen como manchas blancas.
- 50
- La Figura 11 muestra el vector pYS MFalfa1 lisozima scFv NorpA para expresión en levadura del polipéptido de fusión MFalfa1 lisozima scFv NorpA como la molécula de despliegue en la cual el NorpA es el compañero de
- 55

enlazamiento del segundo sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora (es decir, InaD) y la lisozima es el polipéptido modificado.

La Figura 12 muestra un sistema invertido en el cual se utiliza el vector pYD NBC1 Aga2-NorpA para expresión en levadura de la NBC1 Aga2-NorpA.

- 5 La Figura 13 muestra un sistema invertido en el cual se utiliza el vector pYS6/CT\*MFalfa1-InaD-Fn10 para expresión en levadura de la MFalfa1-InaD-Fn10.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 10 Tal como se utiliza aquí, el término "célula huésped" se refiere a una célula eucariota que ha sido modificada para que exprese una molécula de la superficie de la célula, una molécula adaptadora, y una molécula de despliegue. Asimismo, se debe entender que la célula huésped secreta o excreta la molécula de despliegue antes de enlazar la molécula de despliegue con la molécula adaptadora sobre la superficie de la célula huésped.

- 15 Tal como se utiliza aquí, el término "molécula de la superficie de la célula" se refiere a un péptido, polipéptido, dominio de enlazamiento, ligando, lípido, o carbohidrato que es dirigido hacia la superficie extracelular de la célula huésped. La molécula de la superficie de la célula puede ser anclada a la superficie de la célula mediante enlace covalente o enlace no covalente. La molécula de la superficie de la célula puede incluir un fosfolípido, carbohidrato, o proteína a través de la cual ésta se une a la superficie de la célula huésped. La molécula de la superficie de la célula puede ser un polipéptido que se enlaza a, o que se conjuga con, un fosfolípido, un carbohidrato o un polipéptido sobre la superficie de la célula. Por ejemplo, el polipéptido puede utilizar un ancla de fosfatidil-inositol-glicano (GPI) para unirse a la superficie de la célula huésped, tal como  $\alpha$ -aglutininas,  $\alpha$ -aglutininas, y floculinas. La molécula de la superficie de la célula también puede ser una proteína de membrana con un dominio de enlazamiento localizado sobre la superficie de la célula huésped que se puede enlazar al primer sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora.

- 25 Tal como se utiliza aquí, el término "molécula adaptadora" se refiere a un péptido, polipéptido, dominio de enlazamiento, ligando, lípido, o carbohidrato o combinación de los anteriores que tiene dos sitios de enlazamiento distintos. La molécula adaptadora tiene un sitio de enlazamiento que se enlaza específicamente a la molécula de la superficie de la célula y un segundo sitio de enlazamiento distinto que se enlaza específicamente a la molécula de despliegue. Sin limitar la invención, los dos sitios de enlazamiento del polipéptido pueden ser dominios de polipéptido cada uno con su propia afinidad de enlazamiento con una molécula diferente que están fusionados entre sí. Por ejemplo, el polipéptido puede ser una subunidad de  $\alpha$ -aglutinina, tal como Aga2p, fusionada a un dominio PDZ, o puede ser una floculina, tal como Flo1, fusionada a un dominio PDZ.

- 30 Tal como se utiliza aquí, el término "primer sitio de enlazamiento" se refiere a una región de la molécula adaptadora que reconoce específicamente y se enlaza a al menos una porción de la molécula de la superficie de la célula. Por ejemplo, el primer sitio de enlazamiento puede comprender un péptido, polipéptido, dominio de enlazamiento, ligando, lípido, o carbohidrato o combinación de los mismos que se enlaza específicamente a una molécula de la superficie de la célula que podría incluir, sin limitación, un péptido, dominio de enlazamiento, ligando, proteína, lipoproteína, lípido, o carbohidrato. Más específicamente, pero sin limitar la invención, el primer sitio de enlazamiento puede referirse a la subunidad Aga2p, de  $\alpha$ -aglutinina que se enlaza específicamente a la subunidad Aga1p de  $\alpha$ -aglutinina a través de puentes de disulfuro. En general, se pueden utilizar cualquiera de los dos compañeros de enlazamiento molecular para el primer sitio de enlazamiento y la porción correspondiente de la molécula de la superficie de la célula. Los ejemplos incluyen iones  $\text{Ni}^{2+}$  y etiquetas de polihistidina, residuos de azúcar y Concanavalina A, p-aminofenil- $\beta$ -D-tiogalactósido y  $\beta$ -galactosidasa (Germino et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 80: 6848 (1983), glutationa y glutationa-S-transferasa (Smith, D. B. y Johnson, K. S. Gene 67: 31 (1988); proteína A de estafilococo e IgG (Uhlen, M. et al., Gene 23: 369 (1983)), proteínas de enlazamiento de níquel calmodulina (CNBP) y calmodulina-agarosa (Stofko-Hahn, R. E. et al., FEBS Lett. 302(3): 274 - 278); estreptavidina o avidina y biotina (Takashige, S. y Dale, G. L., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 85: 1647 - 1651 (1988)); amilasa y dominio de la proteína de enlazamiento de maltosa del gen malE de *E. coli* (Bach, H. et al., J. Mol. Biol. 312: 79 - 93 (2001)), cualquier epítipo y su anticuerpo correspondiente (véase Kolodziej, P. A. y Young, R. A., Methods Enzymol. 194: 508 - 519 (1991), por ejemplo, el octapéptido FLAG<sup>TM</sup> o anticuerpo de antidigoxigenina y digoxigenina).

- 50 Tal como se utiliza aquí, el término "segundo sitio de enlazamiento" se refiere a una región de la molécula adaptadora que reconoce específicamente y se enlaza a la molécula de despliegue. Por ejemplo, el segundo sitio de enlazamiento puede comprender un péptido, polipéptido, dominio de enlazamiento, ligando, lípido o carbohidrato que se enlaza específicamente a un péptido, ligando, proteína, lipoproteína, lípido o carbohidrato que comprende la molécula de despliegue. De manera más específica, pero sin limitaciones, el segundo sitio de enlazamiento se puede referir a un dominio PMZ que se enlaza específicamente a un ligando de NorpA. También se puede utilizar cualquiera de los pares de enlazamiento adecuados para el primer sitio de enlazamiento para el segundo sitio de enlazamiento en tanto que estos no reconozcan los mismos compañeros.

5 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "molécula de despliegue" se refiere a una molécula que se puede localizar en la superficie de la célula huésped mediante enlazamiento de la molécula adaptadora sobre la superficie de la célula huésped. La molécula de despliegue típicamente comprende la molécula (o biblioteca de moléculas) que va a ser desplegada y un compañero de enlazamiento que es enlazada específicamente por el  
 10 segundo sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora. En ciertos casos, la molécula que va a ser desplegada y el compañero de enlazamiento pueden ser los mismos. A manera de ejemplo, la molécula de despliegue puede incluir un péptido, polipéptido, dominio de enlazamiento, ligando, lípido o carbohidrato o una combinación de los mismos. Debe entenderse que la molécula de despliegue se expresa o bien se genera dentro de la célula huésped y es secretada o excretada fuera de la célula para que sea desplegada sobre la superficie de dicha célula. La  
 15 molécula de despliegue puede comprender una biblioteca de moléculas variadas que se pueden tamizar por enlazamiento a un objetivo o por actividad mejorada o alterada. En ciertas realizaciones, la biblioteca puede incluir polipéptidos modificados. La molécula de despliegue puede incluir también una etiqueta o péptido que puede ser marcado para detectar el enlazamiento de la molécula de despliegue con la superficie de la célula, o clasificación de las células huésped que despliegan dicha molécula.

15 Como se utiliza en la presente solicitud, el término "polipéptido modificado" se refiere a cualquier polipéptido de interés que se fusiona a un péptido, polipéptido, dominio de enlazamiento, ligando, lípido o carbohidrato que específicamente se enlaza con un péptido, ligando, proteína, lipoproteína, lípido, o carbohidrato que comprende el segundo sitio de enlazamiento de la molécula adaptadora, y se despliega sobre la superficie de la célula huésped (y es por lo tanto es un componente de la molécula de despliegue). Los ejemplos no limitantes del polipéptido  
 20 modificado son proteínas de andamiaje, proteínas de transducción de señal, anticuerpos, inmunoglobulinas, inmunoadhesinas, receptores, ligandos, oncoproteínas, factores de transcripción, y enzimas.

Como se utiliza en la presente solicitud, el término "pluralidad de las moléculas de despliegue" se refiere a al menos dos copias de la molécula de despliegue desplegadas sobre la superficie de las células huésped. En ciertos casos, cada molécula única de despliegue se despliega por medio de una célula huésped diferente.

25 Como se utiliza en la presente solicitud, el término "componente del polipéptido modificado" se refiere a cualquiera de los compañeros de enlazamiento de origen natural de cualquier fragmento del péptido modificado. Los ejemplos no limitantes incluyen una cadena ligera de inmunoglobulina que se enlaza con una cadena pesada de inmunoglobulina, una molécula de biotina que se enlaza con avidina, dos subunidades de  $\alpha$ -hemoglobina que se dimerizan, una cadena pesada de miosina que se enlaza con una cadena ligera de miosina, dos monómeros de glicoforina A que se dimerizan, o dos monómeros de cualquier proteína dimerica de origen natural que se enlaza con  
 30 otra.

Como se utiliza en la presente solicitud, el término "biblioteca de células huésped" se refiere a una pluralidad de células huésped, en las cuales cada célula huésped comprende un polipéptido modificado no idéntico que se despliega sobre la superficie de la célula.

35 Como se utiliza en la presente solicitud, el término "polipéptido modificado no idéntico" se refiere a la secuencia de aminoácido de al menos dos polipéptidos modificados, en donde cada secuencia de aminoácidos comprende sustituciones, inserciones, o supresiones de aminoácidos que se diferencian de un polipéptido modificado desplegado sobre la superficie de una célula huésped de otro polipéptido modificado desplegado sobre la superficie de una segunda célula huésped.

40 Como se utiliza en la presente solicitud, el término "Fn10" se refiere al décimo dominio tipo III de fibronectina humana.

#### Moléculas de despliegue

Las moléculas de despliegue se pueden utilizar para desplegar cualquier molécula que pueda ser expresada o bien generada en una célula huésped. Los ejemplos no limitantes de dichas moléculas se presentan a continuación.

#### 45 Andamiaje del anticuerpo

Las moléculas de despliegue pueden ser inmunoglobulinas. Los métodos para generar bibliotecas de inmunoglobulinas fueron inicialmente desarrollados para desplegar las inmunoglobulinas a través del fago, pero desde entonces se han desarrollado métodos adicionales de despliegue. Todos los métodos de generación de bibliotecas para estos métodos alternativos de despliegue pueden ser adaptados para permitir el despliegue  
 50 utilizando los métodos divulgados en la presente solicitud. El método de ejemplo para la generación de bibliotecas de anticuerpos puede encontrarse en: las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.223.409, 5.403.484; y 5.571.698 para Ladner et al.; las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.427.908 y 5.580.717 para Dower et al.; las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.969.108 y 6.172.197 para McCafferty et al.; y las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 para Griffiths et al.

55

Andamiaje que no es de anticuerpo

Las estructuras o andamiajes conocidos que no son de inmunoglobulina que se pueden desplegar utilizando los métodos divulgados en la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, fibronectinas (Compound Therapeutics, In., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd. (Cambridge, MA) y Ablynx nv (Zwijnaarde, Bélgica)), lipocalina (Anticalina) (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), inmunofarmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilina (gama-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania), imitadores de epítipo de proteína (Polyphor Ltd., Allschwil, Suiza).

(i) Fibronectinas

Los andamiajes de adnectina se basan en el dominio tipo III de fibronectina (por ejemplo, el decimo modulo de fibronectina tipo III (dominio 10 Fn3). El dominio tipo III de fibronectina tiene 7 u 8 cadenas beta las cuales se distribuyen entre dos laminas beta, que por si mismas se empacan una contra la otra para formar el núcleo de la proteína, y también contienen bucles (análogos a las CDR) que conectan las cadenas beta entre sí y quedan expuestas al disolvente. Existen por lo menos tres de dichos bucles en cada borde del sándwich de lamina beta, en donde el borde es el limite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta. (patente de los Estados Unidos No. 6.673.901).

Estos andamiajes a base de fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue completo este cercanamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional mas pequeño, la región variable de la cadena pesada, la cual comprende la unidad de reconocimiento completa del antígeno en IgG de camello y de llama. Debido a esta estructura, la molécula de fibronectina que no es de inmunoglobulina imita las propiedades de enlazamiento del antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de dichos anticuerpos. Estos andamiajes se pueden utilizar en una estrategia de desordenamiento y aleatorización del bucle *in vitro* que es similar al proceso de maduración por afinidad de los anticuerpos *in vivo*. Estas moléculas a base de fibronectina se pueden utilizar como andamiajes en los cuales las regiones del bucle de las moléculas pueden ser reemplazadas con las CDR de la divulgación utilizando técnicas de clonación estándar.

(ii) Compañeros moleculares de Anquirina

La tecnología se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición derivados de anquirina como andamiajes para soportar regiones variables que pueden ser utilizadas para enlazamiento a objetivos diferentes. El modulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste de dos hélices  $\alpha$  antiparalelas y un giro  $\beta$ . El enlazamiento de las regiones variables se optimiza principalmente utilizando despliegue en ribosoma.

(iii) Maxicuerpos/Avímeros - Avidia

Los avímeros se derivan de proteína que contiene dominio de A natural tal como LRP-1. Estos dominios son utilizados por la naturaleza para interacciones proteína-proteína y en los humanos casi 250 proteínas están basadas estructuralmente en los dominios A. Los avímeros consisten de una cantidad de diferentes monómeros (2 - 10) del "dominio de A" enlazados mediante enlazadores tipo aminoácido. Se pueden crear avímeros que se puedan enlazar al antígeno objetivo utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en 20040175756; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

(iv) Aficuerpo de Proteína A

Los ligandos de afinidad Affibody® son proteínas sencillas, pequeñas constituidas por un haz de triple hélice basado en el andamiaje de uno de los dominios de enlazamiento de IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de superficie proveniente de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de andamiaje consiste de 58 aminoácidos, 13 de lo cuales se ubican al azar para generar las bibliotecas Affibody® con un numero grande de variantes de ligando (véase por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.831.012). Las moléculas de Affibody® imitan anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, el cual es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de enlazamiento de las moléculas de Affibody® es similar al de un anticuerpo.

(v) Anticalinas - Pieris

Las Anticalinas® son productos desarrollados por la compañía Pieris ProteoLab AG. Estas se obtienen a partir de lipocalinas, un grupo ampliamente diseminado de proteínas pequeñas y robustas que usualmente están implicadas en el transporte fisiológico o el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se presentan en tejidos o en líquidos corporales humanos.

La arquitectura de la proteína recuerda a la de las inmunoglobulinas, con bucles hipervariables encima de una estructura base rígida. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas están constituidas de una sola cadena de polipéptido con 160 a 180 residuos aminoácidos, siendo solo marginalmente mas grandes que un dominio individual de inmunoglobulina.



El conjunto de cuatro bucles, que constituyen el bolsillo de enlazamiento, muestra una plasticidad estructural pronunciada y tolera una variedad de cadenas laterales. Por lo tanto, el sitio de enlazamiento puede ser reconfigurado en un procedimiento registrado con el fin de reconocer moléculas objetivo prescritas de diferente forma con alta afinidad y especificidad.

- 5 Una proteína de la familia de lipocalina, la proteína de enlazamiento de bilina (BBP) de *Pieris Brassicae* ha sido utilizada para desarrollar anticualinas mediante sometimiento a mutagénesis del conjunto de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe "anticualinas" es PCT WO 199916873.

(vi) Proteínas de Afilina - Scil

- 10 Las moléculas de Affilin™ son proteínas pequeñas que no son de tipo inmunoglobulina que se diseñan para afinidades específicas hacia proteínas y moléculas pequeñas. Las nuevas moléculas de Affilin™ pueden ser seleccionadas muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de las cuales se basa en una proteína de andamiaje diferente obtenida de humano.

- 15 Las moléculas de Affilin™ no muestran ninguna homología estructural con las proteínas de inmunoglobulina. Las proteínas de Scil emplean dos andamiajes de Affilin™ uno de los cuales es gamma-cristalino, una proteína estructural del cristalino humano y la otra es una proteína de la superfamilia de la "ubiquitina". Ambos andamiajes humanos son muy pequeños, muestran estabilidad a temperaturas altas y son casi resistentes a cambios en el pH y agentes desnaturizantes. Esta alta estabilidad se debe principalmente a la estructura de lamina beta expandida de las proteínas. Los ejemplos de proteínas derivadas a partir de gamma-cristalina se describen en el documento W0200104144 y los ejemplos de proteínas tipo "ubiquitina" se describen en el documento W02004106368.

- 20 (vii) Imitadores del epítipo de proteína (PEM)

Los PEM son moléculas tipo péptido, cíclicas, de tamaño medio (peso molecular 1 - 2 kDa) que imitan las estructuras secundarias de la horquilla beta de las proteínas, la estructura secundaria principal implicada en las interacciones proteína - proteína.

Sin Andamiaje

- 25 Además de los andamiajes que son útiles para la nueva generación de moléculas con afinidad específica, los métodos divulgados en la presente solicitud se pueden utilizar para desplegar cualquier otra molécula biológica que pueda ser expresada o bien generada en la célula huésped. Las bibliotecas de dichas moléculas biológicas, particularmente polipéptidos que pueden ser codificados por polinucleótidos para expresión fácil por la célula huésped, se pueden tamizar respecto a características de interés mejoradas tales como un enlazamiento mejorado  
30 entre receptor y ligando en donde el receptor o el ligando son parte de la molécula de despliegue o actividad enzimática mejorada en donde la enzima es parte de la molécula de despliegue.

Sistemas de expresión

- 35 Se pueden utilizar vectores de expresión para expresar una o más de las moléculas de la superficie de la célula, la molécula adaptadora y la molécula de despliegue, en la célula huésped. Los vectores de expresión para células huésped eucariotas típicamente incluyen (i) elementos de ADN de eucariota que controlan el inicio de la transcripción, tal como un promotor, (ii) elementos de ADN de eucariota que controlan el procesamiento de los transcritos, tales como una secuencia de señal de terminación / poliadenilación de la transcripción, y (iii) opcionalmente, elementos de ADN de eucariota que controlan la replicación en la célula huésped eucariota si el vector va a ser replicado de manera independiente (por ejemplo, vectores que no son de integración). Para la  
40 construcción fácil de tales vectores de expresión, los vectores pueden incluir opcionalmente (iv) elementos de ADN de procarionota que codifiquen para un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibiótica para proveer el crecimiento y selección del vector de expresión cuando se manipula el vector en la célula huésped bacteriana. Los vectores de expresión eucariotas apropiados para uso con huéspedes celulares de mamífero, de levadura y de hongo son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Powels et al. (Cloning Vectors: A  
45 Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985).

- 50 Las células huéspedes de levadura son de interés particular e incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Pichia methanolica*. Estos vectores incluyen vectores basados en Yip tales como Yip5, vectores YRp tales como YRp17, vectores YEp tales como YEp13 y vectores YCp, tales como YCp19. Existe una cantidad de vectores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura. Otro ejemplo de los vectores YEp incluye YEp24, YEp51, y YEp52, los cuales son vehículos para clonación y expresión útiles en la introducción de construcciones genéticas en *S. cerevisiae* (véase, por ejemplo, Broach et al. (1983) en *Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouye Academic Press, p. 83). Estos vectores también son vectores de transferencia en el sentido que estos pueden replicarse en *E. coli* debido a la presencia de pBR322 ori, y en *S. cerevisiae* debido al determinante de replicación del plásmido de 2 micras de levadura.

- 55 Los promotores apropiados para función en levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato

5 quinasa (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess et al., J. Adv. Enzyme Req. 7, 149 (1968); y Holland et al. Biochemistry 17, 4900 (1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfo-fructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa; triosafofosfato isomerasa, fosfo-glucosa isomerasa, y glucoquinasa. Los  
 10 vectores y promotores apropiados para uso en expresión en levadura se describen también en R. Hitzeman et al., EP073.657. Otros promotores apropiados para expresión en levadura incluyen a los promotores de GAL1 (galactosa), PGK (fosfoglicerato quinasa), ADH (alcohol deshidrogenasa), AOX1 (alcohol oxidasa), HIS4 (histidinol deshidrogenasa), y similares. Muchos vectores para clonación en levadura se pueden conseguir fácilmente y se pueden modificar de acuerdo con la discusión anterior. Incluso otros promotores, que tienen la  
 15 ventaja adicional de transcripción controlada mediante las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas con el metabolismo del nitrógeno, y la metalotioneína y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa antes mencionadas, así como enzimas responsables de la utilización de maltosa y la galactosa. Finalmente, los promotores que son activos únicamente en uno de los dos tipos de apareamiento haploide pueden ser apropiados en algunas circunstancias.  
 Entre estos promotores específicos de haploides, los promotores de feromona MFa1 y MFa1 son de interés particular.

20 La secreción a partir de células huésped de levadura de los componentes que incluyen a la molécula adaptadora (si se produce en la célula huésped) y la molécula de despliegue se puede incrementar mediante el uso de cualquiera de las secuencias de señal de secreción disponibles de proteínas de levadura. Un ejemplo es la secuencia líder de un precursor de feromona de apareamiento de levadura, factor  $\alpha$ , el cual también ha sido utilizado para dirigir la secreción de proteínas heterólogas en levadura (véase, por ejemplo, Valenzuela, P., eds., páginas 269 - 280, Butterworths, Londres; Brake, A. J. (1990) Meth. Enzymol. 185, 408 - 441). La secuencia líder del factor  $\alpha$ , además del péptido de señal del terminal N de 17 residuos, incluye una pro-región hidrofílica la cual contiene 72 residuos y porta tres sitios de glicosilación enlazados a N. La pro-región es glicosilada exhaustivamente en el retículo  
 25 endoplasmático y en el aparato de Golgi y es escindida por la endopeptidasa Kex2 en el compartimiento de Golgi tardío. La presencia de la pro-región en el terminal N se cree que permite que algunas proteínas heterólogas pasen el control de calidad en el retículo endoplasmático y lleguen al periplasma.

30 Otro ejemplo es la secuencia líder proveniente de la invertasa de levadura (MLLQAFLFLLAGFAAKISADAHKS) (SEQ ID NO: 1). Se ha demostrado que esta secuencia líder es escindida a partir del péptido heterólogo naciente después de su entrada en el retículo endoplasmático. La enzima responsable de la escisión de la presecuencia, Kex2, reside en la red del trans Golgi. Un ejemplo adicional es la secuencia de señal de la fosfatasa ácida de levadura la cual se puede utilizar para dirigir la secreción de los componentes descritos en la presente solicitud.

35 Los métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas son descritos, por ejemplo, por Kawasaki, patente de los Estados Unidos No. 4.599.311, Kawasaki et al., patente de los Estados Unidos No. 4.931.373, Brake, patente de los Estados Unidos No. 4.870.008, Welch et al., patente de los Estados Unidos No. 5.037.743, y Murray et al., patente de los Estados Unidos No. 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan mediante el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia a un fármaco o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema preferido de vector para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema del vector POT1 divulgado por Kawasaki et al. (patente de los Estados Unidos No. 4.931.373), el cual permite que las  
 40 células transformadas se puedan seleccionar mediante crecimiento en medio que contiene glucosa.

45 Los sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltose* son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132: 3459 (1986), y Cregg, patente de los Estados Unidos No. 4.882.279. Se pueden utilizar células de *Aspergillus* de conformidad con los métodos de McKnight et al., patente de los Estados Unidos No. 4.935.349. Los métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* son divulgados por Sumino et al., patente de los Estados Unidos No. 5.162.228. Los métodos para transformar *Neurospora* son divulgados por Laambowitz, patente de los Estados Unidos No. 4.486.533.

50 Par ejemplo, el uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes es divulgado por Raymond, patente de los Estados Unidos No. 5.716.808, Raymond, patente de los Estados Unidos No. 5.736.383, Raymond et al., Yeast 14: 11 - 23 (1998), y en las publicaciones internacionales Nos. WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para uso en la transformación de *P. methanolica* comúnmente se preparan como plásmidos circulares bicatenarios, los cuales de preferencia se vuelven lineales antes de la transformación. Para la producción de polipéptido en *P. methanolica*, se requiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean aquellos de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen para utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen aquellos de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma del huésped, se prefiere tener el segmento completo de expresión del plásmido flanqueado  
 55 en ambos extremos por secuencias de ADN del huésped. Para procesos industriales a gran escala en los cuales es deseable reducir al mínimo el uso de metanol, se prefiere utilizar células huésped en las cuales ambos genes de  
 60

utilización de metanol (AUG1 y AUG2) sean suprimidos. Para producción de proteína secretadas, se prefieren células huésped deficientes en genes de proteasa vacuolar (PEP4 y PRB1). Se utiliza electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contenga ADN que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolica*. Las células de *P. methanolica* se pueden transformar mediante electroporación utilizando un campo eléctrico pulsado que decae exponencialmente que tiene una intensidad de campo de 2.5 a 4.5 kV/cm, preferiblemente aproximadamente de 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, más preferiblemente aproximadamente de 20 milisegundos.

Para uso de células huéspedes de mamífero, los vectores de expresión de mamífero también son bien conocidos en la técnica y también se pueden utilizar. Los ejemplos de células huésped de mamífero apropiadas incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), células de riñón embrionario humano (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de hámster bebe (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón canino (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasman et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555, 1986)), células de pituitaria de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H4-II-E; ATCC CRL 1548) células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias de murino (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

### Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos no limitantes de los sistemas, composiciones y métodos descritos en la presente solicitud. Las proteínas se desplegadas sobre la superficie de células de levadura utilizando el dominio PDZ de la proteína InaD de levadura y los 5 aminoácidos del terminal C de la proteína NorpA de levadura. Este sistema de despliegue de proteína de tres componentes consiste de un vector que expresa la proteína que va a ser desplegada con una señal de secreción fusionada en su terminal N, y el ligando de NorpA fusionado en el terminal C; un segundo vector que expresa una proteína adaptadora que se puede enlazar específicamente a una proteína de la pared celular de levadura, y que se fusiona al dominio PDZ de InaD, el cual se enlaza específicamente al ligando de NorpA; y un tercer vector que expresa una proteína de la pared celular de levadura que se enlaza específicamente a la proteína adaptadora. Este sistema ha sido adaptado para ser usado en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

#### Ejemplo 1: Despliegue en levadura utilizando la interacción de InaD/NorpA en *Pichia pastoris*

El sistema de despliegue de proteína para *P. pastoris* se desarrolló para desplegar un dominio tipo III de fibronectina (Fn 10), mediante fusión de una secuencia de secreción híbrida (MFalfa/HSA) o una secuencia líder de levadura (MFalfa1) en el terminal N de Fn10 y que fusiona el ligando de NorpA a su terminal C. Una vez que se expresa, el Fn10 fue secretado de la célula y el ligando de NorpA enlazado específicamente al dominio PDZ de InaD a través de puentes de disulfuro. La InaD se fusionó al terminal C de la proteína Aga2p. La proteína de fusión Aga2p-InaD sirvió como la proteína adaptadora, y la Aga2p del terminal N enlazó a Aga1p, la cual fue inmovilizada sobre la superficie de la célula. Aga2p se enlazó específicamente a Aga1p a través de puentes de disulfuro.

El sistema de tres componentes que consiste de la proteína de fusión Fn10-NorpA, la proteína de fusión Aga2p-InaD, y la proteína de la superficie de la célula Aga1p se clonó en vectores de expresión pPIC, bajo el control de un promotor inducible. El promotor inducible utilizado fue el promotor AOX1, el cual es inducido por metanol. Por lo tanto, cuando se agregó metanol a células de levadura transformadas con los vectores, se expresaron las tres proteínas. Aga1p se expresó sobre la superficie de la célula. Aga2p-InaD se localizó en la superficie de la célula en donde la región del terminal N de Aga2p-InaD se enlazó a Aga1p. Fn10-NorpA se localizó en la ruta secretora, se secretó de la célula, y se enlazó a InaD a través del ligando de NorpA del terminal C (Figura 1). El sistema también se puede conmutar de tal manera que InaD se fusiona a Aga1 y NorpA se fusiona a Aga2p (Véase las Figuras 12 y 13).

Una etiqueta de epítipo c-myc se fusionó entre el ligando de NorpA y el terminal C de Fn10. El epítipo c-myc permitió la detección de la fibronectina desplegada mediante el uso de un anticuerpo para c-myc. El anticuerpo para c-myc marcado en forma fluorescente enlazado al epítipo c-myc sobre la superficie de la célula se detectó mediante clasificación de la célula activada por fluorescencia (FACS).

#### Cepas y medios

Se utilizó la cepa Top10 de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) como la cepa huésped para manipulación de ADN recombinante. La cepa GS115 de *P. pastoris* (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) se utilizó para la producción de la proteína de fusión AGA2-InaD y HSA/MFalfa1-Fn10-NorpA. Se cultivó *E. coli* en medio LB (1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, y 0,5% de cloruro de sodio) que contenía 100 µg/mL de ampicilina. Se cultivó *P. pastoris* en medio BMGY (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0), 1,34% de base nitrogenada de levadura,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina, y 1% de glicerol), y medio BMMY (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0), 1,34% de base nitrogenada de levadura,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina, y 0,5 - 2,0% de metanol).

## Construcción de los plásmidos de expresión

Se sintetizó el gen correspondiente a AGA1 por Geneart y subclonado en pPIC3.5 (Invitrogen). El vector resultante fue denominado pPIC3.5-AGA1 (Figura 2). El gen ancla AGA2-InaD fue sintetizado por Geneart (Alemania) y subclonado en el vector de expresión pPIC6a (Invitrogen) utilizando los sitios de restricción BstI y EcoRI. El vector resultante se denominó pPIC6-AGA2-InaD (Figura 4). El constructo de fibronectina consiste del líder híbrido MFalfa1/HSA seguido por la fibronectina fusionada en el terminal C a la secuencia del ligando de NorpA. El gen completo fue sintetizado por Geneart (Alemania) y subclonado en pPICHOLI-1 (Mobitec). El vector resultante se denominó pPICHOLI-1 MFalfa1HsaFn10-NorpA (Figura 6).

## Transformación de levadura

La cepa electro-competente GS115 de *P. pastoris* (Invitrogen) se preparó de acuerdo con el protocolo especificado por el proveedor y cotransformado con pPIC3.5-AGA1, pPIC6-AGA2-InaD, y pPICHOLI-1 MFalfa1Hsa-Fn10-NorpA digeridos con Sall.

## Condiciones de cultivo

Los transformantes de levadura se cultivaron previamente en medio BMGY que contenía 100 µg/ml de Zeocina y 200 µg/ml de Blastidina a 30°C durante 16 horas y se utilizaron para inocular 200 ml de medio BMGY (que contenía 100 µg/ml de Zeocina y 200 µg/ml de Blastidina) en un matraz encamisado de 1 litro para obtener un valor inicial de OD<sub>600</sub> de 0,1. Después de 24 horas de cultivo, se lo centrifugó a 1000 g durante 10 minutos y se lo resuspendió en medio BMMY (+100 µg/ml de Zeocina y 200 µg/ml de Blastidina) que contenía 0,5%, 1,0%, o 2,0% de metanol. Para mantener la inducción de las proteínas de fusión, se añadió metanol al 100% cada 24 horas al cultivo hasta las concentraciones finales mencionadas anteriormente. El análisis de las fibronectinas desplegadas sobre la superficie de la levadura se realizó utilizando FACS y anticuerpo anti-myc.

**Ejemplo 2:** Sistema de conmutación para secretar o desplegar fibronectinas sobre la superficie de *Pichia pastoris*

Una variante del sistema de despliegue anterior permite la escogencia entre secreción y despliegue de proteínas de *P. pastoris*. Para lograr esto, se clona la construcción de fibronectina que consiste del líder híbrido MFalfa1/HSA seguido por fibronectina fusionada en el terminal C a la secuencia del ligando de NorpA en pPICHOLI-C en lugar de pPICHOLI-1. El vector resultante se denomina pPICHOLI-C MFalfa1Hsa-Fn10-NorpA (Figura 8). La diferencia clave entre los dos vectores es el promotor, que en pPICHOLI-1 es el promotor AOX1 inducido por metanol, y en pPICHOLI-C es el promotor Cup1 inducido por cobre. Para desplegar la fibronectina sobre la superficie de *P. pastoris*, se inducen AGA1 y AGA2-InaD con metanol, mientras que pPICHOLI-C se induce con cobre. Esto permite la captura de la fibronectina secretada sobre la superficie de levadura mediada a través de la interacción estrecha de InaD/NorpA. Para la secreción de la fibronectina sin desplegar la proteína sobre la superficie de la levadura, la inducción con cobre es suficiente. Sin la inducción de AGA1 y AGA2-InaD (impulsada por metanol) el compañero de enlazamiento para NorpA (AGA1/AGA2-InaD) no está presente sobre la superficie de la levadura y por lo tanto la fibronectina será secretada.

**Ejemplo 3:** Despliegue en levadura utilizando la interacción de InaD/NorpA en *Saccharomyces cerevisiae*

Este ejemplo describe la utilización del sistema InaD/NorpA con otras cepas de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*

## Cepas y medios

Se utilizó Top 10 de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) como la cepa huésped para manipulación de ADN recombinante. Se utilizó la cepa EBY100 de *S. cerevisiae* (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) para la producción de las proteínas de fusión AGA2-InaD y MSalfa1/HSA-Fn10-NorpA o pYS6CT\*MFalfa1-HSA-NorpA. Se cultivó *E. coli* en medio LB (1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, y 0,5% de cloruro de sodio) que contenía 100 µg/mL de ampicilina o 100 µg/ml de Blastidina. Se cultivó EBY100 en medio CM-URA.

## Construcción de los plásmidos de expresión

Se sintetizó el gen ancla InaD es sintetizado por Geneart (Alemania) y subclonado en el marco con la proteína de ancla AGA2 en el vector de expresión pYD NBC 1 (derivado de pYD1 Invitrogen) utilizando los sitios de restricción HindIII y EcoRI. El vector resultante se denominó pYD\_NBC1 AGA2-InaD (Figura 10). La construcción de fibronectina consiste de la secuencia líder híbrida MFalfa1/HSA seguida por la fibronectina fusionada en su terminal C al ligando de NorpA. El gen completo fue sintetizado por Geneart (Alemania) y subclonado en pYS6CT (Invitrogen), en el cual el origen de replicación había sido remplazado por la región CEN6/ARS4. El vector resultante se denominó pYS6CT\_HSA\_MFalfal\_Fn10\_NorpA (Figura 12).

Se aislaron los plásmidos a partir de *E. coli* y se confirmó la secuencia. Los plásmidos purificados fueron luego transformados conjuntamente en EBY100 y sembrados en medio selectivo que consiste de CM-TRP, + 200 µg/ml de Blastidina. Las colonias transformadas aparecieron en el lapso de 2 días y fueron analizadas respecto al

despliegue de fibronectina mediante análisis FACS utilizando un anticuerpo anti-myc (cccc).

**Ejemplo 4:** Despliegue en levadura utilizando Flo1-InaD/NorpA en *Pichia pastoris*

Este ejemplo describe el uso de un sistema de expresión alternativo, Flo1, el cual se usa con InaD/NorpA en *Pichia pastoris*.

5 Cepas y medios

Se utilizó la cepa Top10 de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) como la cepa huésped para manipulación de ADN recombinante. La cepa GS115 de *P. pastoris* (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) se utilizó para la producción de la proteína de fusión Flo1-InaD y HSA/MFalfa1-Fn10-NorpA. Se cultivó *E. coli* en medio LB (1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, y 0,5% de cloruro de sodio) que contenía 100 µg/mL de ampicilina. Se cultivó *P. pastoris* en medio BMGY (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0), 1,34% de base nitrogenada de levadura,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina, y 1% de glicerol), y medio BMMY (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0), 1,34% de base nitrogenada de levadura,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina, y 0,5 - 2,0% de metanol).

10

Construcción de los plásmidos de expresión

15

El gen para Flo1, fusionado en el terminal C al dominio PDZ de InaD, es sintetizado por Geneart (Alemania) y se clona en pPIC3.5 (Invitrogen) utilizando un sitio 5' EcoR1 y un sitio 3'Not1. El plásmido resultante se denomina pPIC3.5-Flo1-InaD. La expresión de la proteína fusionada es controlada por el promotor inducible con metanol AOX1. La construcción de fibronectina consiste del líder híbrido MFalfa1/HSA seguido por la fibronectina fusionada en el terminal C a la secuencia del ligando de NorpA. El gen completo es sintetizado por Geneart (Alemania) y subclonado en pPICHOLI-1 (Mobitec). El vector resultante se denomina pPICHOLI-1 MFalfa1Hsa-Fn10-NorpA. La expresión de la construcción de fibronectina es controlada por el promotor inducible con metanol AOX1.

20

Transformación de levadura

25

La cepa electro-competente GS115 de *P. pastoris* (Invitrogen) se preparó de acuerdo con el protocolo especificado por el proveedor y cotransformado con pPIC3.5-Flo1-InaD, y pPICHOLI-1 MFalfa1Hsa-Fn10-NorpA digeridos con Sall.

Condiciones de cultivo

30

Los transformantes de levadura se cultivaron previamente en medio BMGY que contenía 100 µg/ml de Zeocina y 200 µg/ml de Blastidina a 30°C durante 16 horas y se utilizaron para inocular 200 ml de medio BMGY (que contenía 100 µg/ml de Zeocina y 200 µg/ml de Blastidina) en un matraz encamisado de 1 litro para obtener un valor inicial de OD<sub>600</sub> de 0,1. Después de 24 horas de cultivo, se lo centrifugó a 1000 g durante 10 minutos y se lo resuspendió en medio BMMY (+100 µg/ml de Zeocina y 200 µg/ml de Blastidina) que contenía 0,5%, 1,0%, o 2,0% de metanol. Para mantener la inducción de las proteínas de fusión, se añadió metanol al 100% cada 24 horas al cultivo hasta las concentraciones finales mencionadas anteriormente. El análisis de las fibronectinas desplegadas sobre la superficie de la levadura se realizó utilizando FACS y anticuerpo anti-myc.

35

**Ejemplo 5:** Tamizaje de una biblioteca de fibronectina

Despliegue de biblioteca de fibronectina

40

Se genera una biblioteca de fibronectina por medio de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo el método divulgado en la patente de los Estados Unidos No. 6.673.901. Otros métodos, tales como el uso de PCR propensa a error, el uso de técnicas de cebado aleatorio, o el uso de técnicas por ordenador son bien conocidos en la técnica y también se pueden utilizar. La biblioteca de fibronectina se diseña con sitios de escisión apropiados con enzima de restricción con el fin de clonar la biblioteca en vectores de expresión de levadura.

45

La biblioteca de fibronectina se despliega sobre una pluralidad de células de *P. pastoris* como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La biblioteca de fibronectina se modifica para que contenga una secuencia líder híbrida MFalfa/HSA fusionada al terminal N y una secuencia del ligando de NorpA fusionada al terminal C. La biblioteca de fibronectina modificada se clona después en el vector pPICHOLI-1. Como en los ejemplos anteriores, la expresión de la biblioteca de fibronectina esta bajo el control del promotor AOX1. Las células de *P. pastoris* se transforman con los vectores pPICHOLI-1 que expresan la biblioteca de fibronectina y los vectores que expresan Aga1p y Aga2p-InaD. La expresión de los componentes se induce mediante la adición de metanol a las células, y la biblioteca de fibronectina se despliega en una pluralidad de células de *P. pastoris*.

50

Tamizaje de biblioteca de despliegue

La biblioteca de despliegue de fibronectina en levadura se tamiza respecto al enlazamiento con una proteína objetivo de interés utilizando uno de muchos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la proteína objetivo se pone en

contacto con la biblioteca de fibronectina de despliegue en levadura bajo condiciones que permitan el enlazamiento específico de la proteína objetivo con cualquiera de los miembros de la biblioteca. Toda proteína objetivo enlazada ahora esta inmovilizada sobre la superficie de una célula de levadura. Se lava toda la proteína objetivo no enlazada. La proteína objetivo enlazada se marca en forma fluorescente utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como anticuerpos marcados en forma fluorescente específicos para la proteína objetivo. La proteína objetivo marcada, ahora inmovilizada sobre la superficie de una célula de levadura, se detecta luego utilizando citometría de flujo, es decir FACS. Las células de levadura que enlazan a la proteína objetivo marcada fluorescerán y se separan de aquellas células de levadura que no enlazan a la proteína objetivo. Las células de levadura separadas que se han enlazado a la proteína objetivo se expanden en forma clonal, y se determinan la línea clonal o la línea que contiene miembros de la biblioteca de fibronectina que enlazan a la proteína objetivo.

#### **Ejemplo 6:** Tamizaje de una biblioteca de proteína

##### Despliegue de biblioteca de proteína

Se genera una biblioteca de proteína utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tal como el uso de PCR propensa a error, el uso de técnicas de cebado aleatorio, o el uso de técnicas que requieren de un ordenador. La biblioteca de proteína se diseña con sitios apropiados de escisión para enzima de restricción con el fin de clonar la biblioteca en vectores de expresión en levadura.

La biblioteca de proteína clonada se despliega en una pluralidad de células de *P. pastoris* como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La biblioteca de proteína se modifica para que contenga una secuencia líder híbrida MFalfa/HSA fusionada al terminal N y una secuencia del ligando de NorpA fusionada al terminal C. La biblioteca de proteína modificada se clona luego en el vector pPICHOLI-1. Como en los ejemplos anteriores, la expresión de la biblioteca de proteína esta bajo el control del promotor AOX1. Las células de *P. pastoris* se transforman con los vectores pPICHOLI-1 que expresan la biblioteca de proteína y los vectores que expresan Aga1p y Aga2p-InaD. La expresión de los componentes se induce mediante la adición de metanol a las células, y, la biblioteca de proteína se despliega sobre una pluralidad de células de *P. pastoris*.

##### Tamizaje de biblioteca de despliegue

La biblioteca de proteína de despliegue en levadura se tamiza respecto al enlazamiento con una proteína objetivo de interés utilizando uno de muchos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la proteína objetivo se pone en contacto con la biblioteca de proteína de despliegue en levadura bajo condiciones que permitan el enlazamiento específico de la proteína objetivo con cualquiera de los miembros de la biblioteca. Toda la proteína objetivo enlazada esta ahora inmovilizada sobre la superficie de una célula de levadura. Se lava toda la proteína objetivo no enlazada. La proteína objetivo enlazada se marca en forma fluorescente utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como anticuerpos marcados en forma fluorescente específicos para la proteína objetivo. La proteína objetivo marcada, ahora inmovilizada sobre la superficie de una célula de levadura, se detecta luego utilizando citometría de flujo, es decir FACS. Las células de levadura que enlazan a la proteína objetivo marcada fluorescerán y se separan de aquellas células de levadura que no enlazan a la proteína objetivo. Las células de levadura separadas que se han enlazado a la proteína objetivo se expanden en forma clonal, y se determinan la línea clonal o la línea que contiene miembros de la biblioteca de fibronectina que enlazan a la proteína objetivo.

#### **Ejemplo 7:** Tamizaje de bibliotecas de fibronectina o HSA

##### Despliegue de biblioteca de fibronectina o HSA

Se genera una biblioteca de fibronectina o HSA por medio de métodos bien conocidos en la técnica, tal como el uso de PCR propensa a error, el uso de técnicas de cebado aleatorio, o el uso de técnicas que requieren de un ordenador. Las bibliotecas se diseñan con sitios apropiados de escisión para enzima de restricción con el fin de clonar las bibliotecas en vectores de expresión en levadura (véase la Figura 8 y la SEQ ID NO: 10).

La biblioteca clonada de fibronectina o la biblioteca clonada de HSA se despliega sobre una pluralidad de células de *P. pastoris* como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La biblioteca de fibronectina se modifica para que contenga una secuencia líder híbrida MFalfa/HSA fusionada al terminal N y una secuencia del ligando de NorpA fusionada al terminal C (pYS HSA\_MFalfa1 Fn10 NorpA). La biblioteca de HSA se modifica para que contenga un MFalfa CT (Terminal C). Este es un sobrante del vector original de Invitrogen utilizado para las construcciones. Si se observa el mapa del vector (por ejemplo la figura 13) se puede observar una secuencia de v5 en el terminal C y de 6xhis del terminal C del inserto. En el mapa se colocó una detención enfrente de esta y no es traducida en la secuencia líder de proteína desplegada final (pYS6/CT HSA-NorpA). La biblioteca modificada de fibronectina o HSA se clona luego en el vector pYS. La expresión de la biblioteca de fibronectina o HSA está bajo el control del promotor T7. Las células de *P. pastoris* se transforman con los vectores pYS que expresan la biblioteca de fibronectina o de HSA y los vectores que expresan Aga1p y Aga2p-InaD. La expresión de los componentes se induce mediante la adición de metanol a las células, y la biblioteca de fibronectina o de HSA se despliega sobre una pluralidad de células de *P. pastoris*.

## (a) Análisis FACS de la expresión en la superficie de la proteína

Las células de levadura que expresan ya sea fibronectina (pYS HSA\_ MFalfa1 Fn10 NorpA) o HSA (pYS6/CT HSA-NorpA) se tiñeron con anticuerpo anti-myc, seguido por anticuerpo antirratón secundario marcado con APC y después sometidas a análisis FACS. Los resultados del análisis se muestran en las Figuras 9A-E. Específicamente, la Figura 9A es la muestra de control que muestra las células de levadura no teñidas; la Figura 9B es una muestra de células de levadura no inducidas que expresan fibronectina; la Figura 9C es una muestra de células de levadura inducidas que expresan fibronectina, que muestra un desplazamiento de las células en comparación con las células no inducidas; la Figura 9D es una muestra de células de levadura no inducidas que expresan HSA; y la Figura 9E es una muestra de células de levadura inducidas que expresan HSA, que muestra nuevamente un desplazamiento de las células en comparación con las células no inducidas. Estos resultados demuestran claramente que el sistema de despliegue en levadura tiene capacidad para expresar moléculas de fibronectina, y proteínas tales como HSA.

## (b) Análisis por tecnología de ensayo fluorométrico de microvolumen (FMAT, Perkin-Elmer) de levadura que expresa fibronectina o HSA

Las células de levadura que expresan ya sea fibronectina (plásmido) o HSA (plásmido) también se analizaron utilizando FMAT mediante tinción con anticuerpo anti-myc y anticuerpo antirratón secundario marcado con APC. Las muestras fueron luego sometidas a microscopia de fluorescencia confocal FMAT y se muestran en las Figuras 10A-E. Aquellas colonias que expresan fibronectina o HSA aparecen como puntos blancos contra un fondo negro. Específicamente, la Figura 10A es la muestra de control que muestra células de levadura no teñidas y aparece completamente negra; la Figura 10B es una muestra de células de levadura no inducidas que expresan fibronectina. Las células de levadura no inducidas no producen fibronectina y no se detectan (la imagen aparece negra); la Figura 10C es una muestra de células de levadura inducidas que expresan fibronectina. En este caso, la inducción conduce a que la fibronectina con una etiqueta de myc sea expresada y detectada utilizando el anticuerpo anti-myc. La detección posterior con el anticuerpo antirratón secundario de APC y microscopia de fluorescencia confocal FMAT da como resultado que se detecten colonias blancas visibles. La Figura 10D es una muestra de células de levadura no inducidas que expresan HSA, como en el caso anterior las células de levadura no inducidas no producen fibronectina y la imagen aparece negra; y la Figura 10E es una muestra de células de levadura inducidas que expresan HSA, mostrando de nuevo colonias blancas pequeñas en comparación con las células no inducidas. Estos resultados confirman además que el sistema de despliegue en levadura es capaz de expresar moléculas de fibronectina, y proteínas, tales como HSA.

30 **Ejemplo 8:** Tamizaje de bibliotecas de Fv monocatenarias

## Despliegue de biblioteca de Fv monocatenaria

Se genera una biblioteca de Fv monocatenaria utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como el uso de PCR propensa a error, el uso de técnicas de cebado aleatorio, o el uso de técnicas que requieren de un ordenador. Las bibliotecas se diseñan con sitios apropiados de escisión para enzima de restricción con el fin de clonar las bibliotecas en vectores de expresión en levadura (véase la Figura 11 y la SEQ ID NO: 11).

La biblioteca clonada de lisozima scFv se despliega sobre una pluralidad de células de *P. pastoris* como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La biblioteca de scFv se modifica para que contenga una secuencia líder MFalfa fusionada al terminal N y una secuencia del ligando de NorpA fusionada al terminal C (pYS6/CT\* MFalfa1-lisozima scFv-NorpA). La biblioteca de lisozima scFv modificada se clona luego en el vector pYS. La expresión de la lisozima scFv está bajo el control del promotor T7. Las células de *P. pastoris* se transforman con los vectores pYS que expresan la biblioteca de lisozima scFv y los vectores que expresan Aga1p y Aga2p-InaD. La expresión de los componentes se induce mediante la adición de metanol a las células, y la biblioteca de fibronectina o de HSA se despliega sobre una pluralidad de células de *P. pastoris*.

## (a) Análisis FACS de la expresión en la superficie de la proteína

45 Las células de levadura que expresan la lisozima scFv se tiñeron con anticuerpo anti-myc, seguido por anticuerpo antirratón secundario marcado con APC y luego sometidas a análisis FACS.

## (b) Análisis FMAT de levadura que expresa fibronectina o HSA

50 Las células de levadura que expresan la lisozima de scFv también se analizaron por medio de FMAT mediante tinción con anticuerpo anti-myc y anticuerpo antirratón secundario marcado con APC. Las muestras se sometieron luego a microscopia de fluorescencia confocal FMAT.

**Ejemplo 9:** Tamizaje de bibliotecas de proteína con un sistema inverso

## Despliegue de biblioteca de proteína

En el Ejemplo, el sistema de despliegue en levadura descrito en la presente solicitud se invierte de modo tal que NorpA se fusiona a Aga2 y la InaD se fusiona a Aga1. Se genera una biblioteca de proteína utilizando métodos bien

conocidos en la técnica, tales como el uso de PCR propensa a error, el uso de técnicas de cebado aleatorio, o el uso de técnicas que requieren de un ordenador. Las bibliotecas se diseñan con sitios apropiados de escisión para enzima de restricción con el fin de clonar las bibliotecas en vectores de expresión en levadura (véanse las Figuras 12 y 13 y las SEQ ID NOs: 12 y 13).

5 El sistema de despliegue de proteína para *P. pastoris* se desarrolló para desplegar un dominio tipo III de fibronectina (Fn10), fusionando una secuencia líder (MFalfa1) en el terminal N de InaD y fusionando el Fn10 a su terminal C. Una vez expresado, el Fn10 fue secretado de la célula y el dominio PDZ de InaD se enlazó al ligando de NorpA a través de puentes de disulfuro. La NorpA se fusionó al terminal C de la proteína Agap2. La proteína de fusión Aga2p-NorpA sirvió como la proteína adaptadora, y la Aga2p del terminal N se enlazó a Aga1p, la cual estaba inmovilizada sobre la superficie de la célula. Aga2p se enlazó específicamente con Aga1p a través de puentes de disulfuro.

10 El sistema de tres componentes que consiste de la proteína de fusión Aga2p-NorpA, la proteína de fusión Aga1-InaD, y la proteína de la superficie de la célula Aga1p se clonó en los vectores de expresión pPD y pYS respectivamente, bajo control de un promotor inducible Gal.

15 El promotor inducible utilizado fue el promotor Gal 1, el cual es inducido por galactosa. Por lo tanto, cuando se agrega galactosa a células de levadura transformadas con los vectores, se expresaron las tres proteínas. Aga1p se expresó sobre la superficie de la célula. Aga2p-Norp se localizó hacia la superficie de la célula en donde la región terminal N de Aga2p-NorpA se enlazó a Aga1p. Fn10-InaD se localizó hacia la ruta secretora, fue secretada de la célula, y enlazada a NorpA a través del ligando InaD del terminal C.

SECUENCIAS

20 pPIC3.5 AGA 1 (956 pb - 3136 pb, directo) 242 aa

**MTLSFAHFTY LFTILLGLTN IALASDPETI LVTITKTNDA NGVVTTTVSP  
 ALVSTSTIVQ AGTTTLYTTW CPLTVSTSSA AEISPSISYA TTLSRFSTLT  
 LSTEVCSHEA CPSSSTLPTT TLSVTSKFTS YICPTCHTTA ISSLSEVGTT  
 TVVSSSAIEP SSASIIISPVT STLSSTTSSN PTTTSLSSTS TSPSSTSTSP  
 SSTSTSSSST STSSSSTSTS SSSTSTSPSS TSTSSSLTST SSSSTSTSQS  
 STSTSSSSTS TSPSSTSTSS SSTSTSPSSK STSASSTSTS SYSTSTSPSL  
 TSSSPTLAST SPSSTISISST FTDSTSSLGS SIASSSTSVS LYSPSTPVYS  
 VPSTSSNVAT PSMTSSTVET TVSSQSSSEY ITKSSISTTI PSFSMSTYFT  
 TVSGVTTMYT TWCPYSSESE TSTLTSMHET VTTDATVCTH ESCMPSQTTS  
 LITSSIKMST KNVATSVSTS TVESSYACST CAETSHSYSS VQTASSSSVT  
 QQTSTKSWV SSMTTSDDEF NKHATGKYHV TSSGTSTIST SVSEATSTSS  
 IDSESQEQSS HLLSTSVLSS SSLSATLSSD STILLFSSVS SLSVEQSPVT  
 TLQISSTSEI LQPTSSTAIA TISASTSSLS ATSISTPSTS VESTIESSSL  
 TPTVSSIFLS SSSAPSSLQT SVTTTEVSTT SISIQYQTSS MVTISQYMGS  
 GSQTRLPLGK LVFAIMAVAC NVIFS (SEQ ID NO: 2)**

pPIC6 A AGA2-InaD (941 pb - 1648 pb, directa) 78 aa



**MQLLRCFSIF SVIASVLAQE LTTICEQIPS PTLESTPYSL STTTILANGK  
AMQGVFEYYK SVTFVSNCGS HPSTTSKGGSP INTQYVFKLL QASGGGGSGG  
GGSGGGGSAS MTGGQOMGRE NLYFQGVPGS SVVSRAGELI HMVTLDKTGTK  
KSGFICIVRG EVKDSPNTKT TGIFIKGIVP DSPAHLGRL KVGDRILSLN  
GKDVRNSTEQ AVIDLIKEAD FKIELEIQTF DK (SEQ ID NO: 3)**

pPICHOLI-1\_MFalfa1Hsa-Fn10-NorpA (884 pb - 1441 pb, directa) 62 aa

**MKWVSFISLL FLFSSAYSRS LDKRENLYFQ GGSVSDVPRD LEVVAATPTS  
LLISWDAPAV TVRYRITYG ETGGNSPVQE FTVPGSKSTA TISGLKPGVD  
YTITVYAVTG RGDSPASSKP ISINYRTEFE NLYFQSGGG GEQKLISEED  
LHHHHHPST PPTPSPSTPP TPSPSYKTQG KTEFCA (SEQ ID NO: 4)**

5 pPICHOLI-C Malfa1Hsa-Fn10-NorpA (691 pb - 1248 pb, directa) 62 aa

**MKWVSFISLL FLFSSAYSRS LDKRENLYFQ GGSVSDVPRD LEVVAATPTS  
LLISWDAPAV TVRYRITYG ETGGNSPVQE FTVPGSKSTA TISGLKPGVD  
YTITVYAVTG RGDSPASSKP ISINYRTEFE NLYFQSGGG GEQKLISEED  
LHHHHHPST PPTPSPSTPP TPSPSYKTQG KTEFCA (SEQ ID NO: 5)**

pYD\_NBC1\_Aga2-InaD (534 pb - 1235 pb, directa) 78 aa

**MQLLRCFSIF SVIASVLAQE LTTICEQIPS PTLESTPYSL STTTILANGK  
AMQGVFEYYK SVTFVSNCGS HPSTTSKGGSP INTQYVFKLL QASGGGGSGG  
GGSGGGGSAS MTGGQOMGRE NLYFQGVPGS SVVSRAGELI HMVTLDKTGTK  
KSGFICIVRG EVKDSPNTKT TGIFIKGIVP DSPAHLGRL KVGDRILSLN  
GKDVRNSTEQ AVIDLIKEAD FKIELEIQTF DK (SEQ ID NO: 6)**

pYS6/CT\_HSA\_MFalphal\_Fn10\_NorpA (513 pb - 1080 pb, directa) 63 aa

10 **MKWVSFISLL FLFSSAYSRS LDKRENLYFQ GGSVSDVPRD LEVVAATPTS  
LLISWDAPAV TVRYRITYG ETGGNSPVQE FTVPGSKSTA TISGLKPGVD  
YTITVYAVTG RGDSPASSKP ISINYRTEFE NLYFQSGGG GEQKLISEED  
LHHHHHPST PPTPSPSTPP TPSPSYKTQG KTEFCA (SEQ ID NO: 7)**

Secuencia de aminoácidos del dominio PDZ de InaD (InaD aa 11 - 107)

**AGELIHMVTL DKTGKKSFGI CIVRGEVKDS PNTKTTGIFI KGIVPDISPAH  
LCGRLKVGDR ILSLNGKDVR NSTEQAVIDL IKEADFKIEL EIQTFDK (SEQ ID  
NO: 8)**

11 aminoácidos del terminales C de NorpA que incluyen el motivo EFCA

YKTQ GKTEFC A (SEQ ID NO: 9)

pYS6/CT\* MFalfa HSA-NorpA

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNST  
NNGLLFINTTIAASIAAKEEGVSLEKREAEAASDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AF  
AQYLQQC PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE  
MADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLV RPEVDVMCTAFHDNEETF LKKYLYE IARR  
HPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQ  
KFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY  
ICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA  
KDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV  
EEPQNL IKQNC ELF EQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH  
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP  
KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC  
CKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSENLYFQGGGGGEQKLI SEEDLHHHHHHHH  
PSTPPTPSPSTPPTPSPSYKTQ GKTEFCA (SEQ ID NO: 10).

pYS6/CT\* MFalfa1-lisozima scFv-NorpA

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNS  
TNNGLLFINTTIAASIAAKEEGVSLEKREAEAASQVKLQQSGAELVKPGASVKLSCTASG  
FNIKDTYMHVWKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSS  
LTS EDTAVYYCARWDWYFDVWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPSSMYT  
SLGERVTITCKASQDINSYLRWFQOKPGKSPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYS  
LTISSLESDDTTTYCLQHGESPYTFGGGKLEIKRAAAEQKLI SEEDLN GSENLYFQG  
SGGGGEQKLI SEEDLHHHHHHHHHPSTPPTPSPSTPPTPSPSYKTQ GKTEFCA (SEQ  
ID NO: 11)

5

pYD\_NBC1\_Aga2-NorpA

MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSP TLESTPYSLSSTTTILANGKAMQGVFEYY  
KSVTFVSNCGSHPSTTSKGS PINTQYVFKLLQASGGGGSGGGGSYKTQ GKTEFCA  
(SEQ ID NO: 12)

pYS6/CT\* MFalfa1-InaD-Fn10 (507 pb - 1487 pb, directa) 109 aa

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNST  
NNGLLFINTTIAASIAAKEEGVSLEKREAEAASAGELIHMVTLDKTGKKSFGICIVRGEV  
KDSPNTKTTGIFIKGIVPDS PAHL CGRLKVGDRILSLNGKDVRN STEQAVIDLIKEADF  
KIELEIQTFDKSGGGGEQKLI SEEDLHHHHHHHPSTPPTPSPSTPPTPSPENLYFQGVSD  
VPRDLEVVAATPTSL LISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGL  
KPGVDY TITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 13)

**REIVINDICACIONES**

1. Una biblioteca de células huésped, en donde cada célula huésped comprende:
  - (a) una molécula de la superficie de la célula unida a la superficie de la célula,
  - (b) una molécula adaptadora que comprende un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento, y
  - 5 (c) una molécula de despliegue que comprende un polipéptido modificado;

en donde el primer sitio de enlazamiento se enlaza específicamente con la molécula de la superficie de la célula y no puede enlazarse con la molécula de despliegue y el segundo sitio de enlazamiento se enlaza específicamente con la molécula de despliegue y no puede enlazarse con la molécula de la superficie de la célula en donde la molécula adaptadora no es un componente del polipéptido modificado, y en donde cada célula huésped comprende un
- 10 2. La biblioteca de células huésped de la reivindicación 1 en donde las células huésped de dicha biblioteca comprende una pluralidad de moléculas de despliegue.
3. La biblioteca de células huésped de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde la molécula de la superficie de la célula huésped está covalentemente enlazada al primer sitio de enlazamiento.
- 15 4. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde la molécula de la superficie de la célula huésped comprende una primera aglutinina que es Aga1p, y en donde el primer sitio de enlazamiento comprende una segunda aglutinina que es Aga2p.
5. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en donde la molécula de la superficie de la célula huésped está unida a la membrana de la célula a través de un ancla GIP.
- 20 6. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en donde el segundo sitio de enlazamiento está covalentemente enlazado a la molécula de despliegue.
7. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en donde el segundo sitio de enlazamiento comprende un dominio PDZ de InaD.
- 25 8. La biblioteca de células huésped de la reivindicación 7, en donde la molécula de despliegue comprende un ligando de NorpA del terminal C.
9. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en donde la molécula de despliegue comprende un dominio PDZ de InaD.
10. La biblioteca de células huésped de la reivindicación 9, en donde el segundo sitio de enlazamiento comprende un ligando de NorpA del terminal C.
- 30 11. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, en donde el polipéptido modificado se selecciona de entre el grupo que consiste de: una proteína de andamiaje, una proteína de transducción de señal, un anticuerpo, una inmunoglobulina, una inmunoadhesina, un receptor, un ligando, una oncoproteína, un factor de transcripción, una enzima, y un polipéptido de fibronectina.
- 35 12. La biblioteca de células huésped de la reivindicación 11, en donde el polipéptido de fibronectina comprende un polipéptido F10.
13. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, en donde la molécula de despliegue comprende: un péptido señal de secreción.
14. La biblioteca de células huésped de la reivindicación 13, en donde el péptido señal de secreción comprende un péptido líder híbrido MFalfa/HSA, o un péptido líder MFalfa.
- 40 15. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14, en donde la expresión de la molécula de despliegue está bajo el control de un primer promotor inducible seleccionado del grupo que consiste de un promotor AOX1, un promotor Cup 1, y un promotor Gal 1.
- 45 16. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 15, en donde la expresión de la molécula adaptadora está bajo el control de un segundo promotor inducible seleccionado de entre el grupo que consiste de un promotor AOX1, un promotor Cup 1, y un promotor Gal 1.
17. La biblioteca de células huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16, en donde la célula huésped es una célula de levadura.

18. Un método para desplegar un polipéptido modificado que comprende

(a) proveer una célula huésped que comprende una molécula de la superficie de la célula unida a la superficie de la célula y un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido de despliegue que comprende un polipéptido modificado,

5 (b) poner en contacto la célula huésped con una molécula adaptadora que comprende un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento bajo condiciones en donde el primer sitio de enlazamiento se enlaza con la molécula de la superficie de la célula, y

10 (c) incubar la célula huésped bajo condiciones en donde la célula huésped exporta al polipéptido de despliegue fuera de la célula huésped bajo condiciones en donde el segundo sitio de enlazamiento se enlaza con el polipéptido de despliegue,

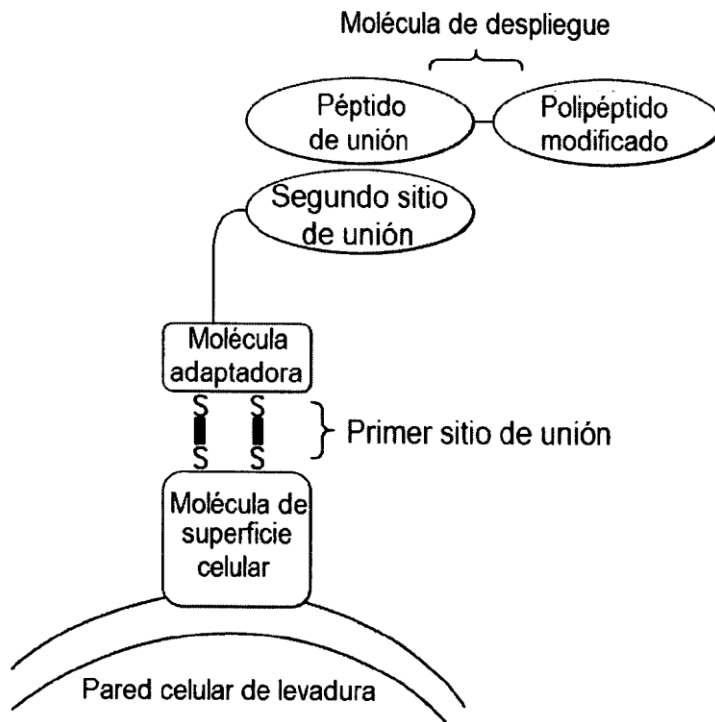
en donde el primer sitio de enlazamiento se enlaza específicamente con la molécula de la superficie de la célula y no puede enlazarse con la molécula de despliegue y el segundo sitio de enlazamiento se enlaza específicamente con el polipéptido de despliegue y no puede enlazarse con la molécula de la superficie de la célula y en donde la molécula adaptadora no es un componente del polipéptido modificado.

15 19. Un método para generar una biblioteca de despliegue de células huésped que comprende:

la introducción dentro de una pluralidad de células huésped de una biblioteca de despliegue de los primeros ácidos nucleicos cada uno codificando un polipéptido de despliegue que comprende un polipéptido modificado, en donde al menos dos de los primeros ácidos nucleicos introducidos codifican diferentes polipéptidos modificados,

20 en donde cada célula huésped comprende un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido de la superficie de la célula y un tercer ácido nucleico que codifica una molécula adaptadora que comprende un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento, en donde el primer sitio de enlazamiento se enlaza con la molécula de la superficie de la célula pero no con el polipéptido de despliegue y el segundo sitio de enlazamiento se enlaza con el polipéptido de despliegue pero no con la molécula de la superficie de la célula, y en donde la molécula adaptadora no es un componente del polipéptido modificado.

25



**FIGURA 1**

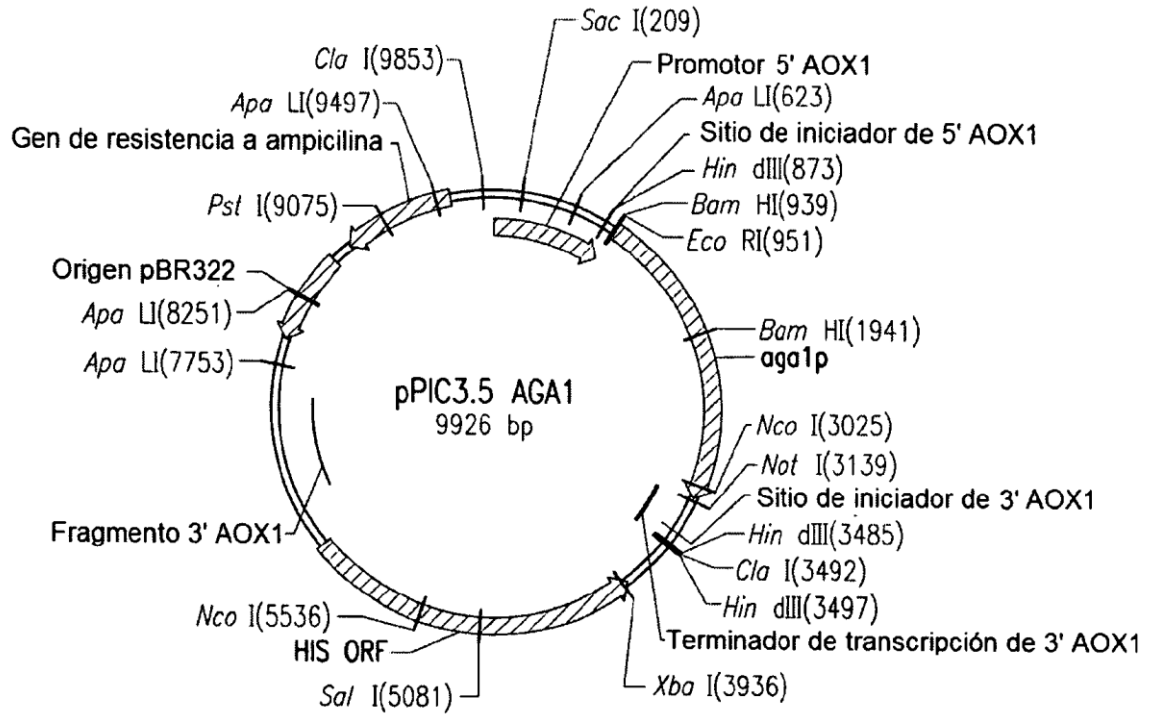


FIGURA 2

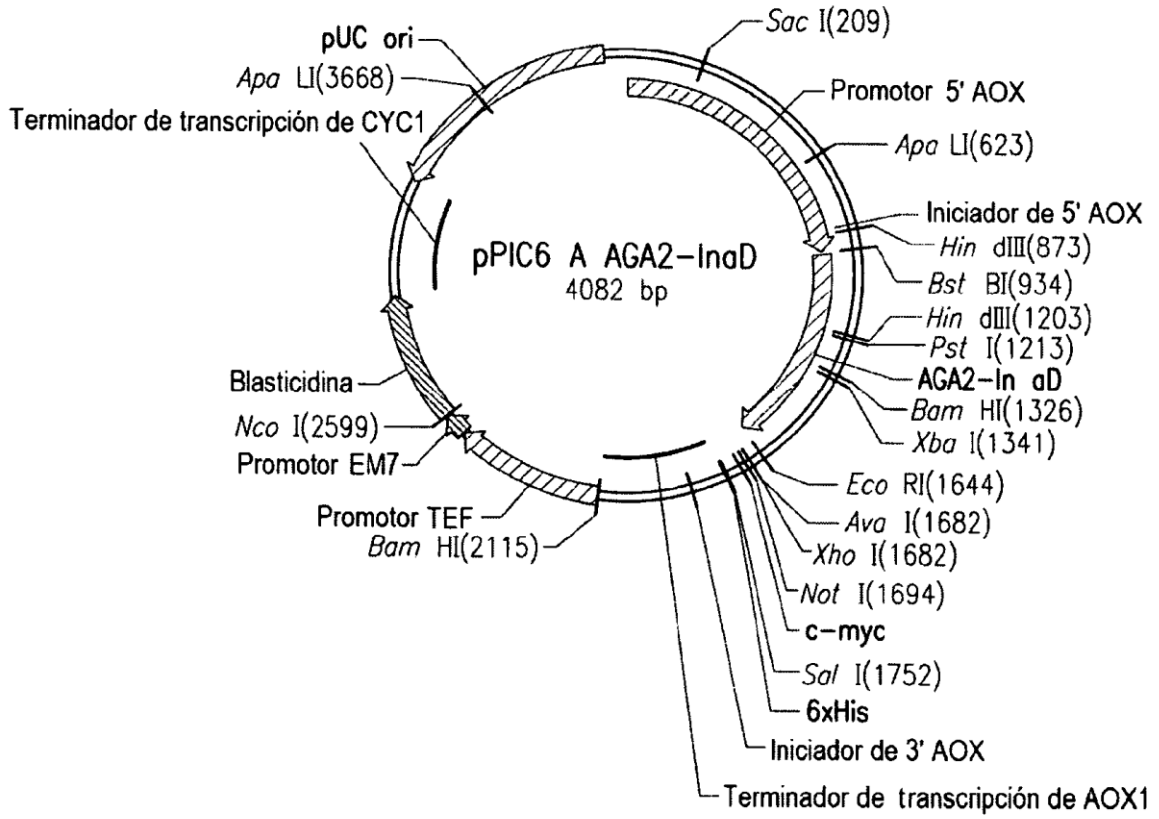


FIGURA 3

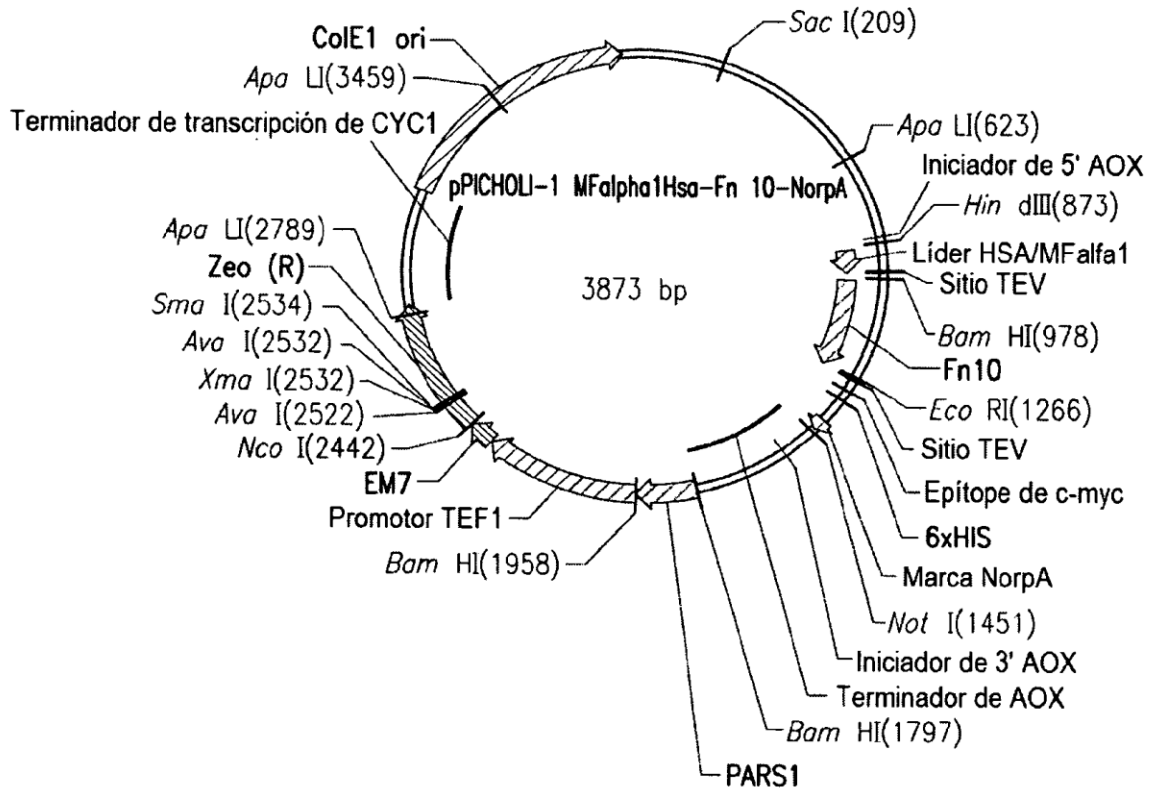


FIGURA 4



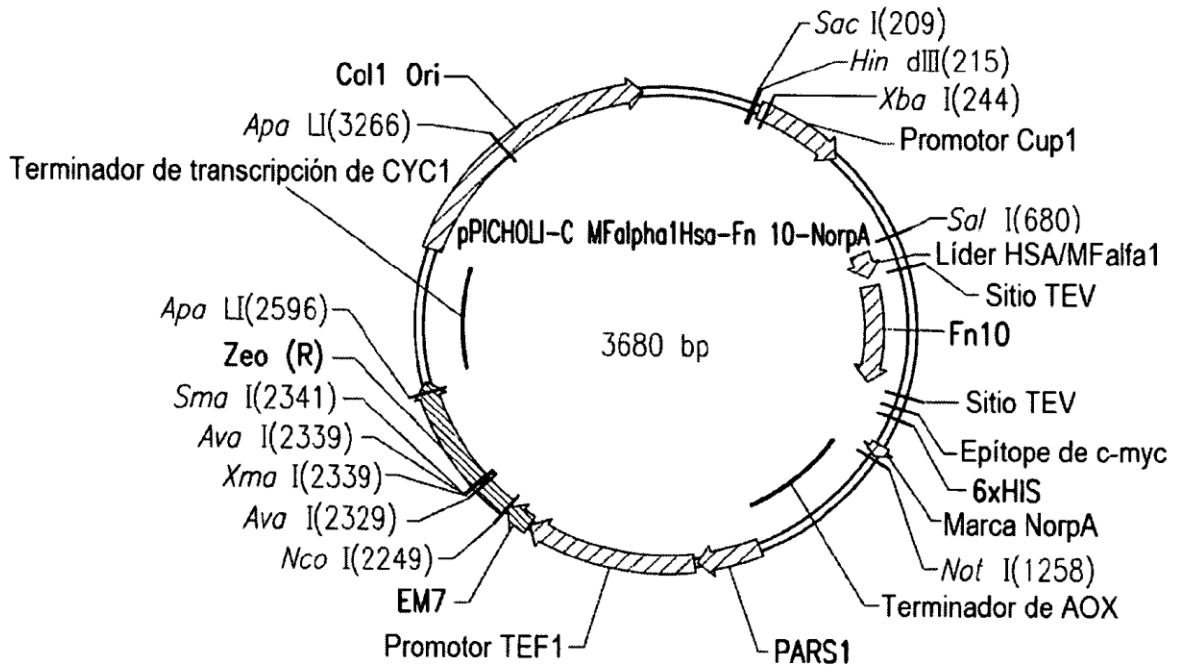


FIG.5

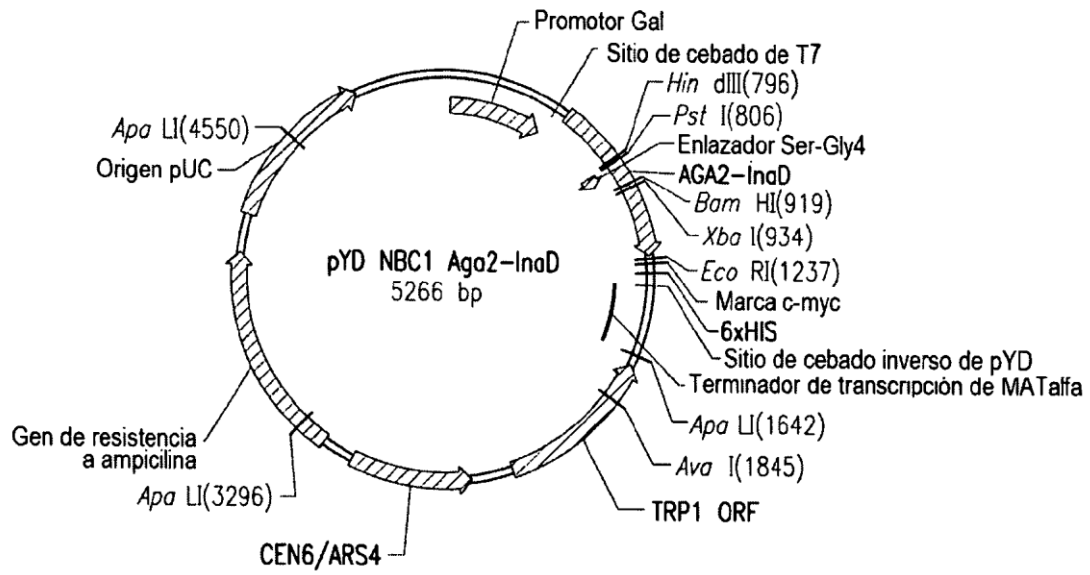


FIGURA 6

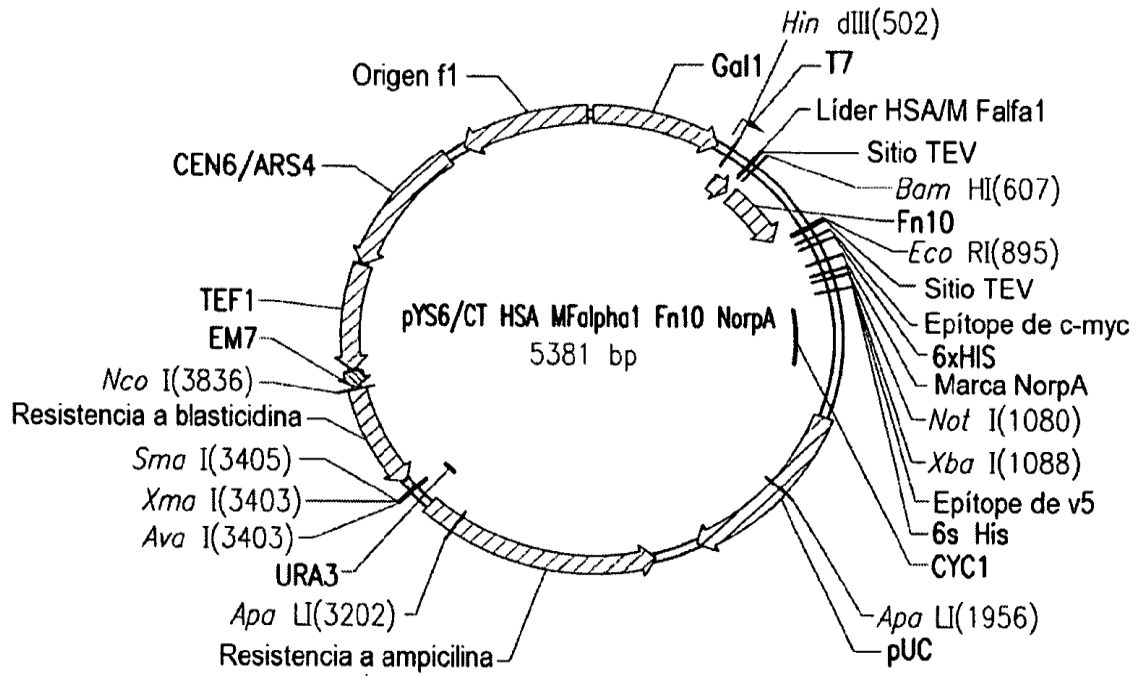


FIGURA 7

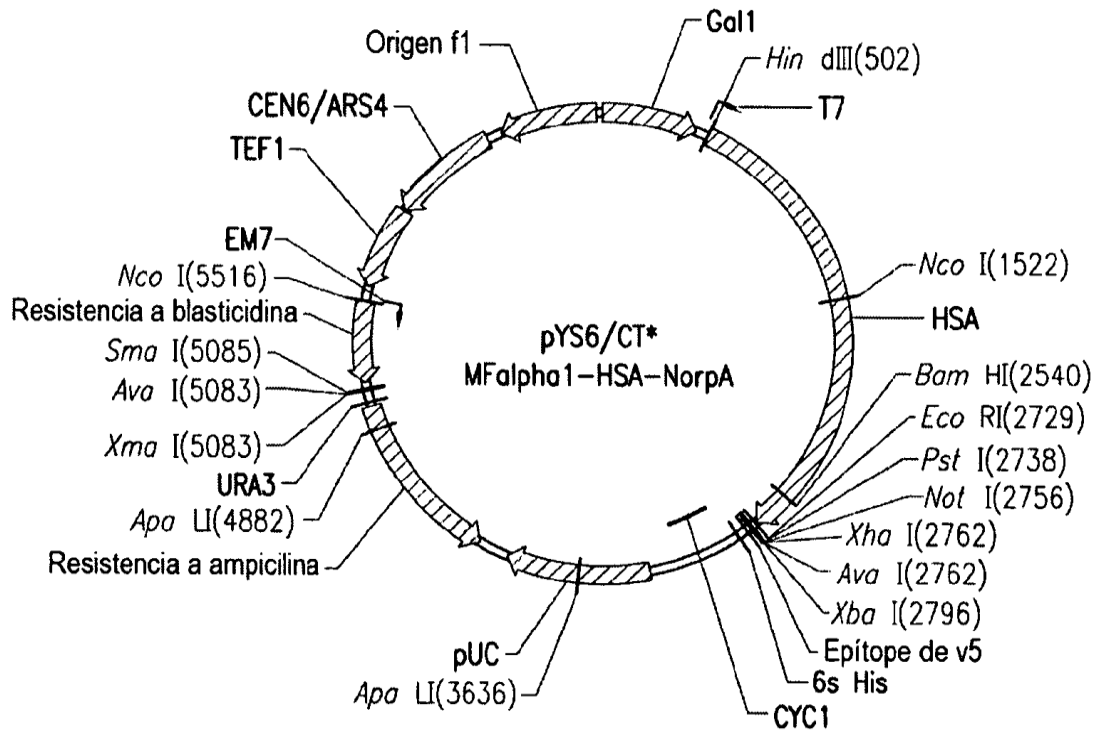


FIGURA 8

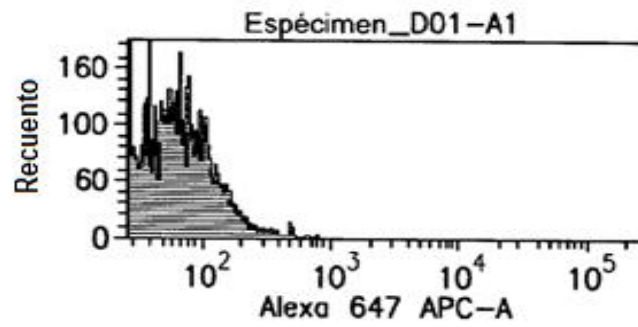


FIGURA 9A

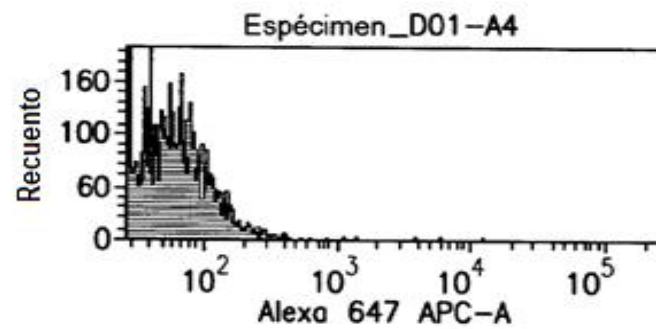


FIGURA 9B

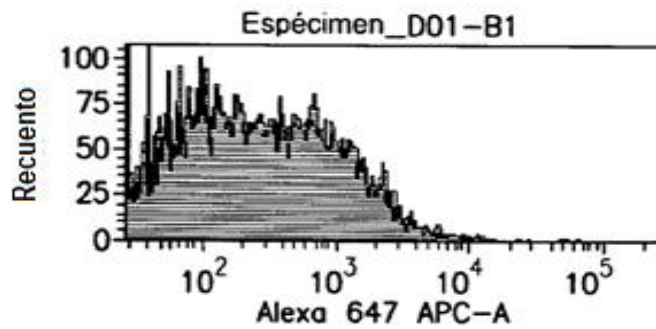


FIGURA 9C

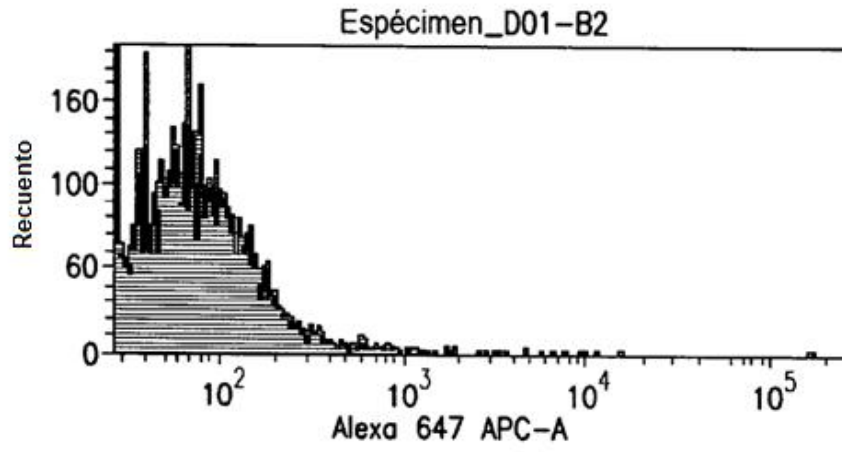


FIGURA 9D

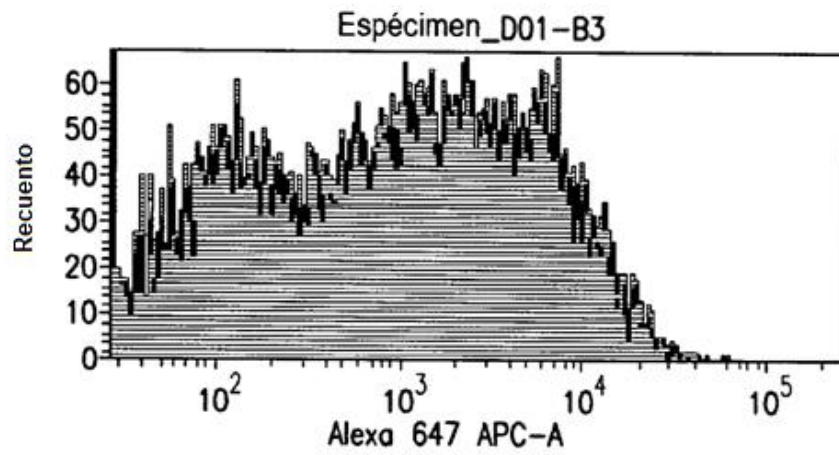


FIGURA 9E

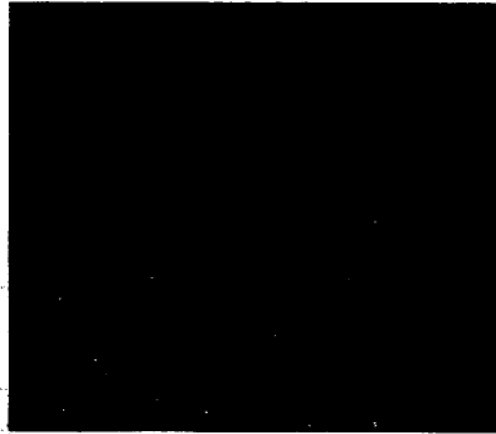


FIG.10A

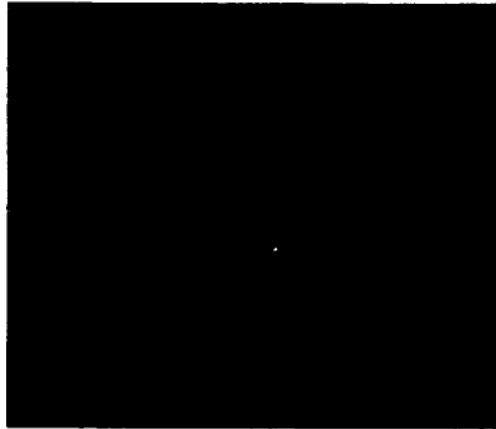


FIG.10B

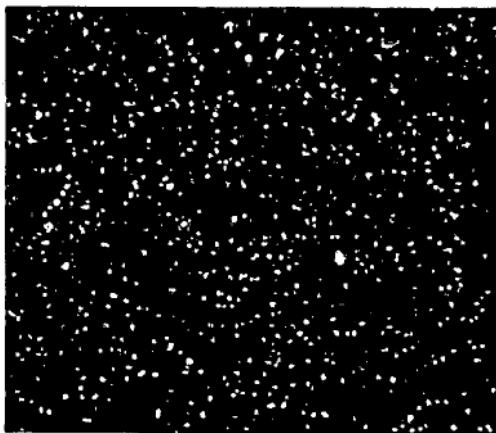


FIG.10C

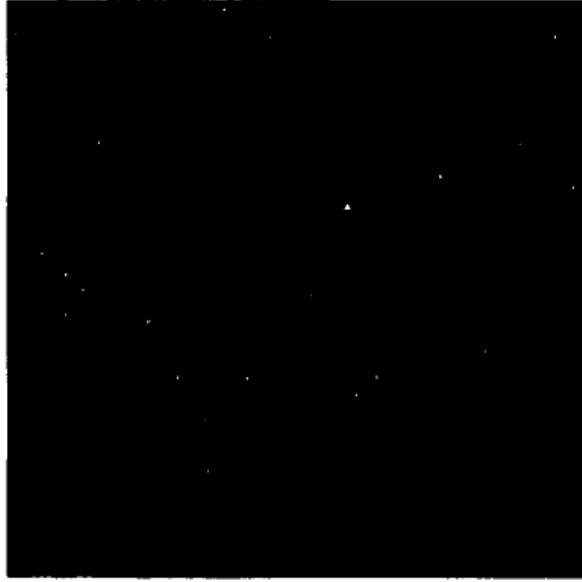


FIG. 10D

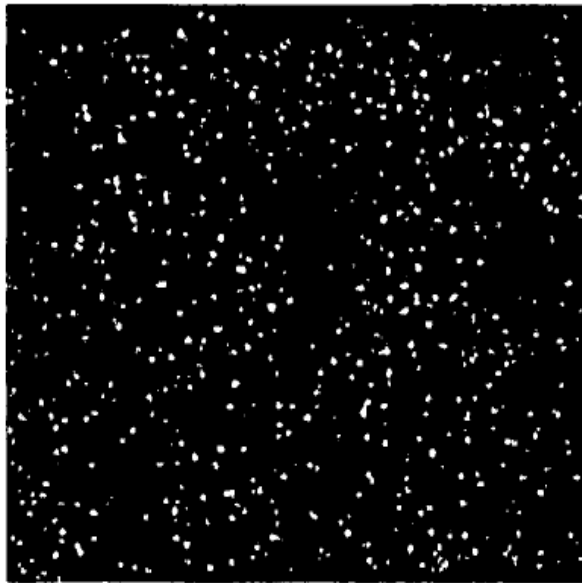


FIG. 10E



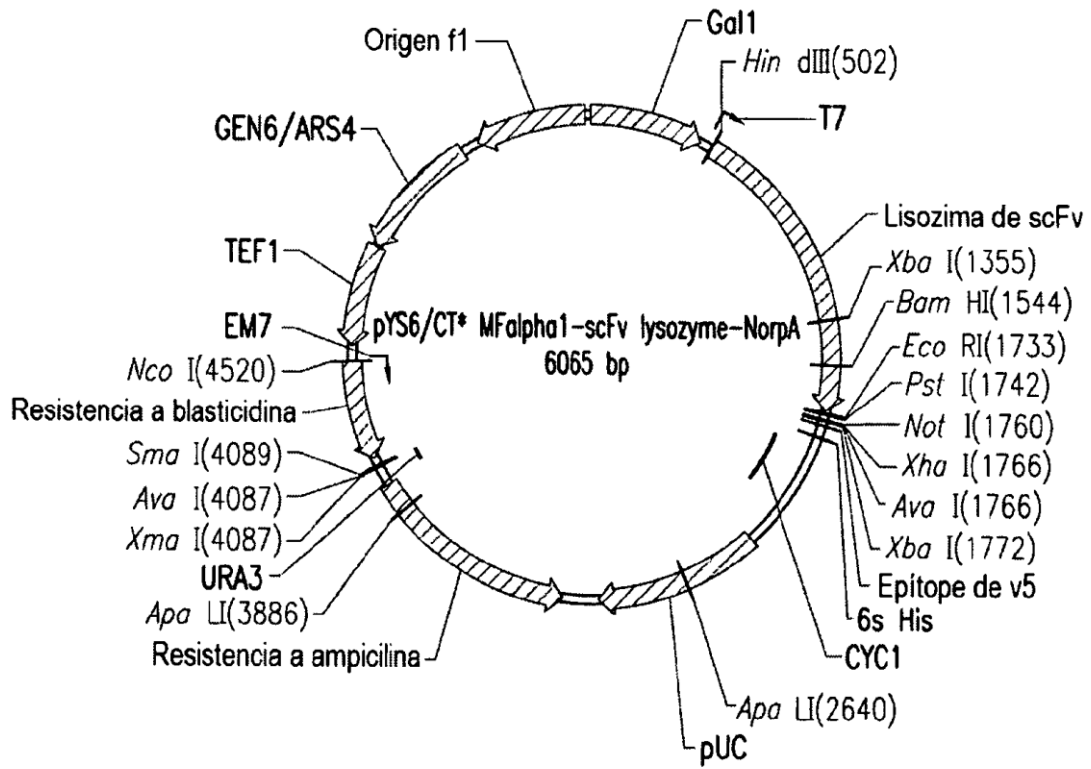


FIGURA 11

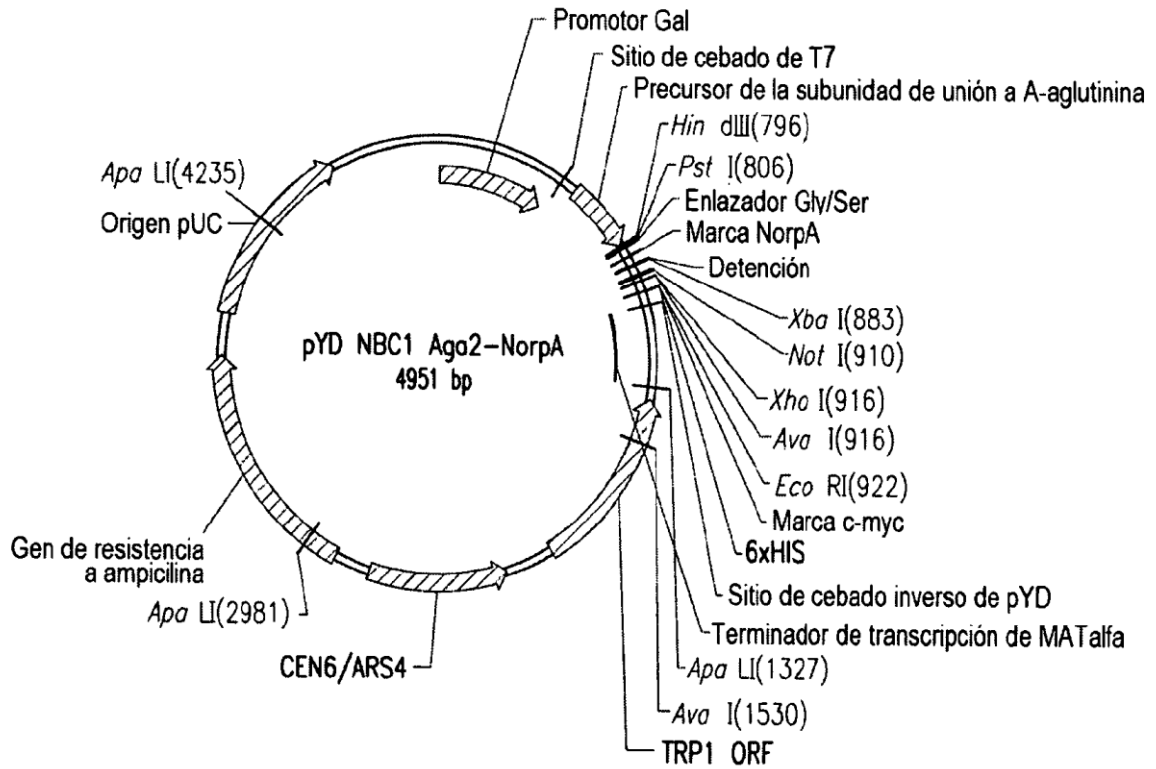


FIGURA 12

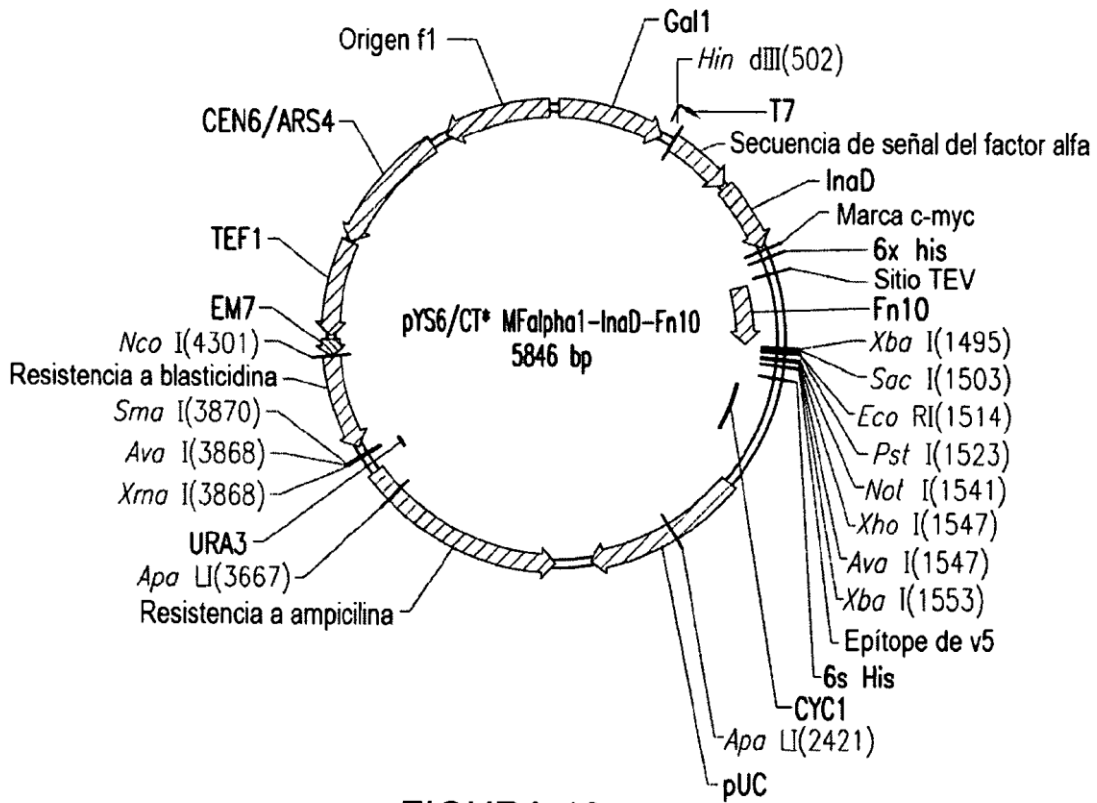


FIGURA 13