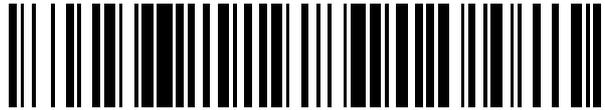


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 091**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.1999 E 99904154 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1056883**

54 Título: **Presentación de proteínas en la superficie de células de levadura y sus usos**

30 Prioridad:

20.01.1998 US 9388

26.08.1998 US 140084

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

26.03.2014

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS (100.0%)
352 Henry Administration Building 506 South
Wright Street
Urbana, IL 68101 , US**

72 Inventor/es:

**WITTRUP, K., DANE;
KIEKE, MICHELE, C.;
KRANZ, DAVID, M.;
SHUSTA, ERIC y
BODER, ERIC, T.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 451 091 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).

Presentación de proteínas en la superficie de células de levadura y sus usos

Descripción

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a los campos de la inmunología y la química de proteínas. Más concretamente, la presente invención se refiere a la presentación de péptidos y proteínas en la superficie de células de levadura para la selección de secuencias con propiedades fenotípicas mejoradas a partir de genotecas combinatorias.

Descripción de los antecedentes de la técnica

15 La estructura del sitio de combinación del anticuerpo puede predecirse con precisión razonable a partir de los datos de la secuencia polipeptídica, pero la capacidad para diseñar racionalmente mejoras en la afinidad y especificidad de unión ha demostrado ser más difícil de alcanzar, a pesar de algunos éxitos (por ejemplo, Roberts *et al.*, '87; Riechmann *et al.*, '92). Como resultado, la mutagénesis y el cribado de genotecas representa actualmente el abordaje más fructífero hacia la maduración dirigida de la afinidad de los anticuerpos. Los métodos de selección y cribado de genotecas combinatorias se han convertido en una herramienta común para modificar las propiedades de reconocimiento de las proteínas (Ellman *et al.*, 1997, Phizicky & Fields, 1995). En concreto, la construcción y el cribado de repertorios inmunitarios de anticuerpos *in vitro* prometen un mejor control sobre la potencia y la especificidad de las interacciones antígeno-anticuerpo.

25 La técnica más extendida es la presentación en bacteriófagos, mediante la cual la proteína de interés se expresa como polipéptido de fusión a una proteína de la cubierta del bacteriófago y posteriormente se criba mediante la unión al ligando biotinilado inmovilizado o soluble (por ejemplo, Huse *et al.*, '89; Clackson *et al.*, '91; Marks *et al.*, '92). Las fusiones se realizan más comúnmente a una proteína de recubrimiento menor, llamada proteína del gen III (pIII), que está presente en una cantidad de tres a cinco copias en la punta del bacteriófago. Un bacteriófago construido de esta manera puede considerarse una "unidad" genética compacta, que posee tanto el fenotipo (la actividad de unión del anticuerpo presentado) y el genotipo (el gen que codifica ese anticuerpo) en un solo paquete. La presentación en bacteriófagos ha sido aplicada con éxito a anticuerpos, proteínas de unión a ADN, inhibidores de proteasas, péptidos cortos y enzimas.

35 Los anticuerpos que poseen propiedades de unión deseables se seleccionan mediante la unión a un antígeno inmovilizado en un proceso llamado "panning". Los bacteriófagos que portan anticuerpos no específicos se eliminan mediante lavado y a continuación los bacteriófagos unidos se eluyen y se amplifican mediante infección de *E. coli*. Este abordaje se ha aplicado para generar anticuerpos contra muchos antígenos, incluidos: el antígeno de superficie de la hepatitis B (Zebedee *et al.*, '92); polisacáridos (Deng *et al.*, '94), factor 1 de crecimiento insulinoide (Garrard y Henner, '93), 2-feniloxazol-5-ona (Riechmann y Weill, '93) y ácido 4-hidroxi-5-yodo-3-nitro-fenacetil-(NIP)-caproico (Hawkins *et al.*, '92).

45 Sin embargo, la presentación en bacteriófagos tiene varias deficiencias. Aunque el "panning" de genotecas de anticuerpos de presentación en bacteriófagos es una tecnología de gran alcance, tiene varias dificultades intrínsecas que limitan su aplicación generalizada con éxito. Por ejemplo, algunas proteínas de la superficie celular y proteínas secretadas eucariotas necesitan modificaciones post-traduccionales tales como la glicosilación o una amplia isomerización de enlaces disulfuro que no están disponibles en las células bacterianas. Además, la naturaleza de la presentación en bacteriófagos excluye la discriminación cuantitativa y directa de los parámetros de la unión a ligando. Por ejemplo, los anticuerpos de afinidad muy alta ($K_D \leq 1$ nM) son difíciles de aislar mediante "panning", ya que las condiciones de elución necesarias para romper una interacción antígeno-anticuerpo muy fuerte son generalmente lo suficientemente rigurosas (por ejemplo, pH bajo, alto contenido en sal) para desnaturalizar la partícula de bacteriófago lo suficiente como para hacerla no infecciosa. Además, el requisito para la inmovilización física de un antígeno en una superficie sólida produce muchos problemas artefactuales. Por ejemplo, la alta densidad superficial del antígeno introduce efectos de avidéz que enmascaran la verdadera afinidad. Además, la inmovilización física reduce la entropía de traslación y de rotación del antígeno, lo que da como resultado una DS menor tras la unión del anticuerpo y una sobrevaloración del resultado de la afinidad de unión con respecto a la del antígeno soluble y los grandes efectos por la variabilidad en los procedimientos de mezcla y lavado conducen a dificultades de reproducibilidad. Además, la presencia de uno solo a unos pocos anticuerpos por partícula de bacteriófago introduce una variación estocástica sustancial y la discriminación entre los anticuerpos de afinidad similar se hace imposible. Por ejemplo, suelen ser necesarias diferencias de afinidad de 6 veces o más para una discriminación eficaz (Riechmann y Weill, '93). Por último, las poblaciones pueden ser superadas por el bacteriófago de tipo silvestre de crecimiento más rápido. En concreto, puesto que pIII está directamente implicada en el ciclo vital del bacteriófago, la presencia de algunos anticuerpos o antígenos unidos evitará o retardará la amplificación del bacteriófago asociado.

Se han desarrollado varios métodos de presentación en la superficie celular bacteriana. Sin embargo, el uso de un sistema de expresión procariota introduce ocasionalmente sesgos de expresión impredecibles y las capas de polisacáridos capsulares bacterianos presentan una barrera de difusión que restringe tales sistemas a ligandos de moléculas pequeñas (Roberts, 1996). *E. coli* posee una cápsula o capa de lipopolisacárido que puede interferir estéricamente con las reacciones de unión macromolecular. De hecho, una presunta función fisiológica de la cápsula bacteriana es la restricción de la difusión de macromoléculas a la membrana celular, con el fin de proteger a la célula del sistema inmunitario (DiRienzo *et al.*, '78). Puesto que el periplasma de *E. coli* no ha evolucionado como compartimento para el plegamiento y ensamblaje de fragmentos de anticuerpos, la expresión de anticuerpos en *E. coli* ha sido por lo general muy dependiente del clon, expresándolos bien algunos clones y otros nada en absoluto. Tal variabilidad introduce preocupaciones acerca de la representación equivalente de todas las secuencias posibles en una genoteca de anticuerpos expresados en la superficie de *E. coli*.

El descubrimiento de nuevos tratamientos se vería facilitado por el desarrollo de sistemas de selección en levaduras. Las similitudes estructurales entre los linfocitos B que presentan anticuerpos y las células de levadura que presentan anticuerpos proporcionan una analogía más estrecha a la maduración de la afinidad *in vivo* que la disponible con el bacteriófago filamentosos. Por otra parte, la facilidad de cultivo y la facilidad de manipulación genética disponible con levadura permitirá mutagenizar y cribar rápidamente grandes poblaciones. A diferencia de las condiciones en el cuerpo de los mamíferos, pueden modificarse las condiciones fisicoquímicas de unión y selección para un cultivo de levadura dentro de un amplio rango de pH, temperatura y potencia iónica, para proporcionar grados de libertad adicionales en los experimentos de diseño de anticuerpos. En el presente documento se ha descrito el desarrollo de un sistema de presentación en la superficie de levaduras para el cribado de genotecas combinatorias de anticuerpos y un cribado basado en la cinética de disociación antígeno-anticuerpo.

Las aplicaciones potenciales del diseño de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades humanas son de gran alcance. En concreto, se han buscado activamente aplicaciones al tratamiento del cáncer y la obtención de imágenes de tumores. Los tratamientos con anticuerpos para la sepsis por gramnegativos todavía son prometedores a pesar de los desalentadores resultados preliminares. Las aplicaciones *in vitro* para la cromatografía de inmunoafinidad, inmunoensayo e inmunohistoquímica ya están bien desarrolladas. Para cada una de estas aplicaciones, resultan deseables anticuerpos con alta afinidad (es decir, $K_D \leq 10$ nM) y una alta especificidad. Pruebas empíricas sugieren que es poco probable que los sistemas de presentación en bacteriófagos o de presentación en bacterias produzcan sistemáticamente anticuerpos de afinidad subnanomolar. Hasta la fecha, la presentación en levaduras llenará este vacío y, como tal, será una tecnología clave de gran importancia comercial y médica.

La importancia de los receptores de linfocitos T para la inmunidad celular se conoce desde los años 80, pero no se ha desarrollado ningún método para diseñar receptores de linfocitos T de mayor afinidad. Aunque varios grupos han producido constructos monocatenarios de receptores de linfocitos T, estos sistemas de expresión han permitido el análisis bioquímico de la unión del receptor de linfocitos T, pero no han permitido métodos de genoteca para modificar esas propiedades de unión de manera dirigida. El receptor de linfocitos T ha sido especialmente difícil de producir en forma soluble. En su forma endógena, es una proteína de membrana heterodimérica ($\alpha\beta$) que se asocia de manera no covalente con las subunidades del complejo CD3 en la superficie de los linfocitos T. Los dominios α y β extracelulares están compuestos de regiones constantes ($C\alpha$ y $C\beta$) y de regiones variables ($V\alpha$ y $V\beta$) que actúan directamente en la unión de un antígeno péptido/MHC. Se han desarrollado varios métodos diferentes para la producción: secreción de $V\alpha V\beta$ a partir de *E. coli*, producción de moléculas híbridas en células de mieloma que consisten en $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ fusionadas a las regiones constantes de la cadena ligera de la inmunoglobulina k, producción de $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ en células de timoma por escisión a partir de una fusión con lípidos de superficie celular (Slanetz *et al.*, 1991), escisión del complejo $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ -z producido por la línea celular de leucemia basófila de rata antes de la región transmembrana con digestión con trombina, producción de $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ en células de insecto infectadas con baculovirus con y sin asociación de cremallera de leucina y secreción de híbridos C_H de inmunoglobulina-gd TCR a partir de células COS (Eilat *et al.*, 1992). Se han construido y producido en *E. coli* fragmentos de TCR monocatenario (scTCR) más pequeños análogos a fragmentos de anticuerpo monocatenario que contienen la subunidad de unión mínima del TCR completo, replegados a partir de cuerpos de inclusión o plegados en el periplasma a niveles de 0,5 mg/l -1,0 mg/l.

La técnica anterior es deficiente al carecer de medios eficaces de presentación de proteínas y péptidos de superficie celular para la selección de secuencias con las propiedades de unión deseables. La técnica anterior también es deficiente al carecer medios eficaces para el diseño del receptor de linfocitos T para unas propiedades de unión mejoradas. Más concretamente, no se ha dispuesto de ninguna tecnología para diseñar receptores solubles de linfocitos T para producir una intervención terapéutica de la inmunidad celular. La presente invención satisface este antiguo deseo y necesidad de la técnica.

Boder y Wittrup, 1997 y Kieke *et al.*, 1997 analizan métodos de presentación en la superficie de células de levadura.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para seleccionar proteínas con propiedades fenotípicas mejoradas con respecto a las de dicha proteína de tipo silvestre, que comprende las etapas de:

5 transformar células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada a una proteína de pared celular de levadura, en el que se utiliza la mutagénesis para generar una población variegada de mutantes de la proteína a ensayar;

10 marcar dichas células de levadura con un primer marcador, en el que dicho primer marcador se asocia con las levaduras que expresan dicha proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan dicha proteína a ensayar;

aislar dichas células de levadura con las que se asocia dicho primer marcador;

15 analizar y comparar dichas propiedades fenotípicas de dicha proteína mutante expresada por la levadura con las propiedades fenotípicas de dicha proteína de tipo silvestre; y

seleccionar las células de levadura que presentan proteínas mutantes con propiedades fenotípicas mejoradas frente a la proteína de tipo silvestre;

20 en el que las propiedades fenotípicas mejoradas son una o más de entre el nivel de expresión en superficie, la estabilidad, los niveles de secreción y la solubilidad.

25 En una forma de realización de la presente descripción, se proporciona un método genético para inmovilizar polipéptidos a la pared celular de levadura de forma accesible para la unión proteína-proteína. La combinación de este método con la clasificación de células activadas mediante fluorescencia proporciona un medio de selección de proteínas con una afinidad aumentada o reducida por otra molécula, especificidad modificada o unión condicional.

30 En otra forma de realización de la presente descripción, se proporciona un método de fusión genética de un polipéptido de interés al extremo C-terminal de la proteína de pared celular de levadura Aga2p. En condiciones de apareamiento, la pared exterior de cada célula de levadura contiene aproximadamente 10^4 moléculas proteicas llamadas aglutininas. Las aglutininas sirven de contacto específico para intervenir en la adhesión de las células de levadura de tipo de apareamiento opuesto durante el apareamiento. En efecto, la levadura ha desarrollado una plataforma para la unión proteína-proteína sin impedimento estérico a partir de componentes de la pared celular. Al fijarse un anticuerpo a la aglutinina, puede imitarse de manera eficaz la presentación en la superficie celular de anticuerpos por parte de los linfocitos B en el sistema inmunitario.

40 En otra forma de realización, se proporciona un método de fusión de un epítipo de identificación de nueve residuos (HA) al extremo C-terminal de la proteína de AGA2. Este péptido corto está accesible en la superficie celular para un anticuerpo en solución sin fijación ni digestión de las células y puede detectarse mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. Por lo tanto, puede utilizarse la levadura para presentar péptidos.

45 En otra forma de realización, se proporciona un método de fusión de un fragmento scFv del anticuerpo monoclonal 4-4-20 al extremo C-terminal de la proteína de AGA2. Este fragmento está accesible en la superficie celular y se une al antígeno con fluoresceína sin fijación ni digestión de las células y puede detectarse mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. Por lo tanto, puede utilizarse la levadura para la presentación de fragmentos de anticuerpos.

50 Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para seleccionar proteínas con propiedades de unión deseables, que comprende: transformar células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada en su extremo N-terminal a una proteína de unión de la pared celular de levadura; marcar las células de levadura con un primer marcador, en el que el primer marcador se asocia con las levaduras que expresan la proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan la proteína a ensayar; seleccionar las células de levadura con las que se asocia el primer marcador; y cuantificar el primer marcador, en el que una gran presencia del primer marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de unión deseables y en el que una baja presencia del primer marcador indica que la proteína a ensayar no tiene las propiedades de unión deseables.

55 Una forma realización preferente de la presente descripción incluye adicionalmente las etapas de: marcar las células de levadura con un segundo marcador, en el que el segundo marcador se asocia con las levaduras que expresan un epítipo de identificación fusionado a la proteína a ensayar y codificado por el vector y no se asocia con las levaduras que no expresan el epítipo de identificación codificado por el vector; cuantificar el segundo marcador, en el que la presencia del segundo marcador indica un número de copias expresadas de la proteína marcada con el epítipo a ensayar en la superficie de células de levadura; y comparar la cuantificación del primer marcador con la cuantificación del segundo marcador para determinar la presencia del primer marcador normalizada a la presencia del segundo marcador, en el que una gran presencia del primer marcador con respecto a la presencia del segundo marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de unión deseables.

65 Otra forma de realización preferente de la presente descripción incluye las etapas de: marcar las células de

levadura con un tercer marcador que compite con el primer marcador por la unión a la proteína a ensayar; marcar las células de levadura con el primer marcador; cuantificar el primer marcador; marcar las células de levadura con el segundo marcador; cuantificar el segundo marcador; y comparar la cuantificación del primer marcador con la cuantificación del segundo marcador para determinar la presencia del primer marcador normalizada a la presencia del segundo marcador, en el que una baja presencia del primer marcador con respecto a la presencia del segundo marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de unión deseables.

En una forma de realización de la presente descripción, el primer marcador es un marcador fluorescente fijado a un ligando y el segundo marcador es un marcador fluorescente fijado a un anticuerpo. Cuando los marcadores son fluorescentes, la etapa de cuantificación se realiza mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia confocal.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un vector para llevar a cabo el método de la presente invención, que comprende una proteína de unión de la pared celular fusionada a un extremo N-terminal de una proteína de interés. Las formas de realización preferentes de este aspecto de la presente descripción incluyen medios de expresión de un epítipo de identificación polipeptídico fusionado a la proteína de interés en las células de levadura. Una forma de realización más preferente proporciona que la proteína de unión de la pared celular es la subunidad de unión de una proteína aglutinina de levadura, incluso más preferentemente la subunidad de unión de la aglutinina de levadura es Aga2p.

Otra forma de realización preferente del presente aspecto de la descripción proporciona que la secuencia de aminoácidos del epítipo de identificación está seleccionada del grupo de YPYDVPDYA (HA) (SEC ID N° 1), EQKLISEEDL (c-myc) (SEC ID N° 2), DTYRYI (SEC ID N° 3), TDFYLK (SEC ID N° 4), EEEEEYMPME (SEC ID N° 5), KPPTPPPEPET (SEC ID N° 6), HHHHHH (SEC ID N° 7), RYIRS (SEC ID N° 8) o DYKDDDDK (SEC ID N° 9) y que el extremo N-terminal de la proteína de interés está fusionado a un extremo C-terminal de la proteína de unión de la pared celular.

En la presente invención, se proporciona un método para seleccionar proteínas con propiedades fenotípicas mejoradas con respecto a las de la proteína de tipo silvestre, que comprende las etapas de: transformar células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada a una proteína de pared celular de levadura, en el que se utiliza la mutagénesis para generar una población variegada de mutantes de la proteína a ensayar; marcar las células de levadura con un primer marcador, en el que el primer marcador se asocia con las levaduras que expresan la proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan la proteína a ensayar; aislar las células de levadura con las que se asocia el primer marcador; y analizar y comparar las propiedades de la proteína mutante expresada por la levadura con las propiedades de la proteína de tipo silvestre, en el que se seleccionan las células de levadura que presentan las proteínas mutantes con propiedades mejoradas frente a la proteína de tipo silvestre. Como se ha descrito anteriormente, puede emplearse un segundo y/o tercer marcador con esta forma de realización, y la selección de proteínas mutadas de interés con propiedades fenotípicas mejoradas puede implicar ciclos iterativos de las etapas de enriquecimiento y marcado.

En formas de realización preferentes, la proteína de pared celular de levadura es una aglutinina; la proteína a ensayar está fusionada por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de una subunidad de unión de aglutinina; la cepa de levadura es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*; la proteína a ensayar es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo Fab, Fv o scFv, más preferentemente la proteína a ensayar es el dominio de unión a ligando de un receptor de superficie celular, aún más preferentemente el receptor de superficie celular es un receptor de linfocitos T.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para seleccionar proteínas mutantes que presentan propiedades fenotípicas mejoradas seleccionadas del grupo que consiste en la expresión en superficie, la estabilidad, el nivel de secreción y la solubilidad, en el que los mutantes de la proteína a ensayar pueden contener mutaciones individuales o mutaciones múltiples.

En otra forma de realización más, puede utilizarse un segundo marcador para determinar cuantitativamente los niveles de expresión en la superficie celular, que pueden utilizarse como ensayo para seleccionar otras propiedades fenotípicas deseables, tales como la expresión intracelular, la estabilidad, la constante de unión, la constante de disociación, el nivel de secreción y la solubilidad.

En otra forma de realización, las proteínas mutantes seleccionadas mediante los métodos de la presente invención pueden caracterizarse adicionalmente clonando el gen que codifica las proteínas mutantes seleccionadas en un vector adaptado para la expresión en un eucariota; y expresando la proteína mutante en el eucariota, en los que las propiedades mejoradas de la proteína mutante se confirman comparando las propiedades fenotípicas de las propiedades mejoradas de la proteína mutante con las propiedades de la proteína de tipo silvestre. Preferentemente, el eucariota está seleccionado del grupo que consiste en mamíferos, insectos o levaduras. Debido a que el fenotipo del mutante seleccionado es una propiedad intrínseca de la "nueva" proteína (es decir, mutada), este abordaje también es aplicable a la expresión del mutante en otros sistemas de expresión no eucariotas.

Se han utilizado la presentación en la superficie de levaduras y la clasificación mediante citometría de flujo para aislar mutantes de un scFv que es específico para la región Vb8 del receptor de linfocitos T. La selección se basa en la unión en equilibrio de dos sondas marcadas con fluorescencia, un dominio Vb8 soluble y un anticuerpo al epítipo de identificación c-myc presente en el extremo carboxilo terminal del scFv. Los mutantes que se seleccionaron en este cribado incluían un scFv con una afinidad tres veces mayor por los clones Vb8 y scFv que eran unidos con afinidades reducidas por el anticuerpo anti-c-myc. Este último hallazgo indica que el sistema de presentación en levaduras puede utilizarse para mapear epítopos conformacionales, que no pueden ponerse de manifiesto mediante cribados de péptidos convencionales. Se calcularon las constantes de unión del antígeno en equilibrio dentro del formato de presentación en superficie, lo que permite cribar mutantes aislados sin necesidad de subclonación y expresión soluble. Sólo se cribó una genoteca relativamente pequeña de células de levadura (3×10^5) que presentaban un scFv mutagenizado al azar para identificar estos mutantes, lo que indica que este sistema proporcionará una poderosa herramienta para el diseño de las propiedades de unión de proteínas de la superficie celular y secretadas por eucariotas.

Otra forma de realización preferente del presente aspecto de la invención proporciona un método para la presentación de proteínas que no se presentan en forma de su secuencia normal ("tipo silvestre"). En el ejemplo mostrado, el receptor de linfocitos T para el antígeno no se expresó en forma de su secuencia de "tipo silvestre". Sin embargo, después de la mutagénesis aleatoria y la selección mediante citometría de flujo con los anticuerpos específicos de conformación apropiados, los receptores mutantes se expresaron en la superficie de células de levadura. Esta estrategia permitirá el descubrimiento de nuevos receptores de linfocitos T y proporciona un método para la presentación de prácticamente cualquier polipéptido. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para seleccionar proteínas por su capacidad de presentación en la superficie de una célula de levadura, que comprende la etapa de: transformar células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada a una proteína de pared celular de levadura, en el que se utiliza la mutagénesis para generar una población variegada de mutantes de la proteína a ensayar; marcar las células de levadura con un primer marcador, en el que el primer marcador se asocia con las levaduras que expresan la proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan la proteína a ensayar; aislar las células de levadura con las que se asocia el primer marcador, cuantificando el primer marcador, en el que una gran presencia del primer marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de presentación deseables y en el que una baja presencia del primer marcador indica que la proteína a ensayar no tiene las propiedades de presentación deseables. Preferentemente, la proteína ensayada es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo Fab, Fv o scFv o el dominio de unión a ligando de un receptor de superficie celular. Un ejemplo representativo de un receptor de superficie celular es un receptor de linfocitos T.

Otros aspectos, características y ventajas adicionales de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de las formas de realización actualmente preferentes de la invención proporcionadas para los fines de la descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para que el tema en el que se logran y pueden entenderse en detalle las anteriormente citadas características, ventajas y objetos de la invención, pueden tenerse descripciones más concretas de la invención por referencia a determinadas formas de realización de la misma que se ilustran en los dibujos adjuntos. Estos dibujos forman parte de la memoria descriptiva. Hay que reseñar que los dibujos adjuntos ilustran formas de realización preferentes de la invención y por lo tanto no deben considerarse limitativos en su alcance.

La **figura 1** es un esquema, que muestra la maduración de la afinidad *in vitro* mediante la presentación en levaduras.

La **figura 2** muestra la ilustración esquemática de la presentación en la superficie de levaduras. Se fusionó un epítipo peptídico de nueve aminoácidos del antígeno de hemaglutinina (HA) al extremo C-terminal de la subunidad Aga2p de la α -aglutinina, seguido de la secuencia scFv anti-fluoresceína de 4-4-20. Se fusionó un epítipo de identificación adicional de diez residuos (c-myc) en el extremo C-terminal del scFv, lo que permitió la cuantificación de la presentación de la fusión independiente de la unión a antígeno por los marcadores HA o c-myc. Puede utilizarse el marcador HA o c-myc para la normalización a la variación del número de proteínas de fusión presentadas en la citometría de flujo con dos marcadores.

La **figura 3** muestra un vector para la presentación en la superficie de levaduras. La **figura 3A** muestra la construcción del vector de pCT202. La **figura 3B** muestra los sitios de restricción específicos y la regulación de la transcripción por la galactosa, los epítopos de identificación c-myc C-terminal y HA N-terminal y el sitio de escisión de la proteasa Factor Xa.

La **figura 4** demuestra que las fusiones presentadas pueden detectarse mediante técnicas de fluorescencia, mostrando un histograma de citometría de flujo de levadura marcada con α -c-myc/a-ratón-PE.

La **figura 5** muestra que la unión del antígeno por 4-4-20 scFv puede detectarse mediante fluorescencia, mostrando un histograma de citometría de flujo de la levadura marcada con FITC-dextrano (2×10^6 Da).

La **figura 6** muestra que la actividad de 4-4-20 y c-myc puede detectarse de forma simultánea y demuestra una correlación 1:1 de señales de fluorescencia; por lo tanto, la variación de la señal de intensidad 1 (FITC)

puede normalizarse a la variación de célula a célula en la expresión de la proteína de interés por la intensidad de la señal 2 (PE).

La **figura 7** muestra la secuencia del casete del gen AGA2-HA-4-4-20-c-myc.

La **figura 8** muestra imágenes de microscopía confocal de levaduras que presentan scFv. Se marcaron con AcMo 9E10 la levadura que contenía el plásmido que dirige la expresión en superficie del péptido HA (**figura 8A**) o la fusión scFv (**figura 8B**), seguido de un conjugado secundario IgG anti-ratón-R-ficoeritrina (PE) y FITC-dextrano. Se recogieron imágenes DIC (paneles superiores), de fluorescencia PE roja (paneles centrales) y de fluorescencia FITC verde (paneles inferiores).

La **figura 9** muestra los análisis de citometría de flujo de las levaduras que presentan scFv. Las cepas de levadura que presentan un péptido irrelevante (**figura 9A**) o el 4-4-20 scFv (**figura 9B**) se marcaron con AcMo 9E10 y FITC-dextrano. Las células que presentaban scFv también se trataron con DTT 5 mM antes del marcado (**figura 9C**). (i) Histogramas univariantes de fluorescencia PE asociada con el marcado mediante 9E10; (ii) histogramas univariantes de fluorescencia FITC; (iii) histogramas bivariantes que muestran la correlación entre la fluorescencia PE y FITC.

La **figura 10** demuestra el enriquecimiento de levaduras que presentan variantes mejoradas de scFv mediante selección cinética y clasificación de células mediante citometría de flujo. Las levaduras que expresan una genoteca de 4-4-20 scFv mutagenizada (**figura 10A**) y una combinación de levaduras resultado de tres rondas de selección cinética y amplificación (**figura 10B**) se sometieron a disociación competitiva de antígeno fluorescente con 5-aminofluoresceína, dejando las células que presentaban los mutantes de unión más estrictos con la relación de intensidad FITC/intensidad PE más elevada.

La **figura 11** muestra una cinética de disociación de la interacción entre la fluoresceína y el scFv presentado en superficie. Se marcaron con AcMo 9E10 y FITC-dextrano levaduras que presentaban 4-4-20 scFv (círculos), mutantes 4M1.1 (cuadrados) aislado de la genoteca y mutantes 4M1.2 (triángulos). Se añadió 5-aminofluoresceína como competidor. Se siguió la media de la intensidad de la fluorescencia FITC de la población de células positivas para 9E10 en función del tiempo. La pendiente de la línea es igual a la velocidad de disociación cinética, y el valor extrapolado en el instante $t = 0$ segundos es igual a la valencia de la interacción. MFI_i = media de la intensidad de fluorescencia relativa de la levadura en el instante $t = i$.

La **figura 12** muestra los niveles de expresión y las propiedades de unión a antígeno del scFv-KJ16 presentado en la superficie de levaduras (sombreado) y el Aga2p/HA testigo (sin sombreado). Se transformó la cepa de levadura EBY100 con scFv-KJ16 clonado en el vector de presentación en levaduras pCT202 o el vector pCT202 en solitario. Después de la inducción en un medio galactosa a 20°C durante toda la noche, se tiñeron las células con anticuerpos fluorescentes y se analizaron mediante citometría de flujo, (**figura 12A**) scFv-KJ16/levadura o Aga2p/HA/levadura teñido con AcMo de ratón anti-HA (12CA5) seguido de IgG de cabra anti-ratón marcada con FITC, (**figura 12B**) scFv-KJ16/levadura o Aga2p/HA/levadura teñido con AcMo de ratón anti-c-myc (9E10) seguido de IgG de cabra anti-ratón marcada con FITC, (**figura 12C**) scFv-KJ16/levadura o Aga2p/HA/levadura teñido con scTCR biotinilado a ~ 10 nM seguido de un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, y (**figura 12D**) scFv-KJ16/levadura teñido con scTCR biotinilado seguido de un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina en presencia (sombreado) o ausencia (sin sombreado) de la IgG KJ 16 intacta a 100 mg/ml.

La **figura 13** muestra la isoterma de unión a antígeno en equilibrio del scFv-KJ16 presentado en la pared celular, determinada mediante citometría de flujo. Se incubó la cepa de levadura EBY100 que presentaba scFv-KJ16 en superficie con distintas concentraciones de scTCR biotinilado, se marcó con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina y se detectó mediante citometría de flujo. Los datos se representaron gráficamente en forma de diagrama de Scatchard o como titulación (detalle) y se determinó una K_D efectiva de ~ 500 nM. MFU se refiere a la media de unidades de fluorescencia.

La **figura 14** muestra los dos histogramas de fluorescencia dimensionales y la ventana de clasificación utilizada para seleccionar los mutantes scFv-KJ16. El scFv-KJ16 clonado en el vector de presentación pCT202 se transformó en la cepa mutágena de *E. coli* XL1-Red (Stratagene) y se propagó durante seis ciclos de crecimiento durante toda la noche. Los plásmidos de la genoteca de mutantes se purificaron y utilizaron en la transformación con LiAc (Gietz *et al.*, 1995) de la levadura EBY100. Después de la inducción a 30°C, las levaduras se clasificaron utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia. (**Figura 14A**) Histograma representativo de la primera ronda de clasificación de células, con la ventana de clasificación indicada y (**figura 14B**) histograma representativo de la cuarta ronda de clasificación (ronda final), que ilustra un enriquecimiento de la población en la ventana de clasificación.

La **figura 15** muestra la media de los niveles de unión al AcMo anti-HA, AcMo anti-c-myc o scTCR biotinilado para diez clones seleccionados al azar a partir de la clasificación final que se muestra en la figura 14B. Se indujeron diez mutantes y wt scFv-KJ16/levadura en medio con galactosa a 30°C durante toda la noche. Las células se analizaron mediante citometría de flujo después de la tinción con AcMo de ratón anti-HA seguido de IgG de cabra anti-ratón marcada con FITC (barras abiertas), de ratón anti-c-myc seguido de IgG de cabra anti-ratón marcada con FITC (barras grises) o scTCR biotinilado a ~ 40 nM seguido de un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (barras negras).

La **figura 16** muestra las distribuciones del marcado con fluorescencia para la unión a anti-c-myc o scTCR de tres mutantes seleccionados que se muestran en la figura 4. Tres clases de mutantes scFv-KJ16/levadura se sometieron a doble tinción con anti-c-myc y scTCR biotinilado seguido de IgG de cabra anti-ratón marcada con FITC y un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, a continuación se analizaron mediante citometría de flujo como se describe en la figura 4. Se muestran las distribuciones de fluorescencia para cada mutante

scFv-KJ16/levadura (sombreado) y wt scFv-KJ16/levadura (sin sombreado). Las **figuras 16A y 16B**, mut4; **figuras 16C y 16D**, mut7; **figuras 16E y 16F**, mut10.

La **figura 17** muestra las isotermas de unión a antígeno en equilibrio para tres mutantes mostrados en la figura 16. Aga2p/HA/levadura, wt scFv-KJ16/levadura y tres scFv-KJ16/levadura mutantes caracterizados en la figura 16 se tiñeron con diversas diluciones de scTCR biotinilado seguido de un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina. Después del análisis mediante citometría de flujo, se realizó un gráfico de las isotermas de unión con MFU en función de la dilución de scTCR.

La **figura 18** muestra el análisis de la secuencia de mut7, mut4 y scFv-KJ16 de tipo silvestre. Los plásmidos procedentes de wt scFv-KJ16/levadura y dos mutantes (mut4 y mut7) se recuperaron mediante rescate de plásmido y se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α para producir plásmidos para la secuenciación, como se describe más adelante. Se realizó el análisis de secuencia utilizando cebadores que flanqueaban el scFv del vector de presentación. Las mutaciones se indican en negrita.

La **figura 19** muestra los perfiles de citometría de flujo de la unión del anticuerpo a la levadura que se ha transformado con un plásmido que contiene un gen monocatenario del receptor de linfocitos T (V α V β). La secuencia normal o de tipo silvestre (wt) se compara con varios mutantes (mTCR7, TCR15, TCR16) que se seleccionaron después de la mutagénesis aleatoria del plásmido scTCR. La selección implicaba la unión del anticuerpo 1B2, que reconoce un epítipo conformacional en el receptor de linfocitos T, seguido de varias rondas de clasificación de células activada mediante fluorescencia. En el primer panel, las células de levadura se tiñeron con un anticuerpo (12CA5) contra el marcador HA. En el segundo panel, las células de levadura se tiñeron con un anticuerpo (1B2) contra el receptor de linfocitos T. Aunque en cada caso el epítipo HA se expresa en la superficie, sólo aquellas células que expresan un plásmido mutagenizado son capaces de expresar el receptor de linfocitos T natural (positivo para 1B2).

La **figura 20** muestra los perfiles de citometría de flujo de la unión del anticuerpo a la levadura que han sido transformados con mutantes dobles a partir de la selección que se muestra en la figura 19. Las células se tiñeron para la citometría de flujo como se describe en la figura 19. Los mutantes dobles expresaron un aumento del nivel del receptor de linfocitos T (es decir, material reactivo a 1B2). Los resultados muestran que combinando las mutaciones individuales es posible potenciar el nivel de expresión en la superficie celular del receptor de linfocitos T.

La **figura 21** muestra la secuencia de las mutaciones que conducen a una expresión potenciada del receptor de linfocitos T de superficie celular. Estas incluían los residuos 17 de la V β , 43 de la V α y 104 de la V α .

La **figura 22** muestra los niveles relativos de secreción de scTCR. Los niveles de expresión soluble (unidades arbitrarias) de scTCR producidos utilizando el sistema de expresión en levaduras con bajo número de copias. Se analizaron los cultivos por triplicado de clones independientes para la actividad ELISA de 1B2.

La **figura 23A** muestra los histogramas de flujo de levadura que presenta scTCR. Se presentan las poblaciones de células seleccionadas para el tipo silvestre y los mutantes representativos simples, dobles y triples. En cada histograma se indica la media de unidades de fluorescencia (fluorescencia FITC: anti-HA, fluorescencia PE: 1B2). Anti-HA indica el número de fusiones de superficie y 1B2 indica el número de células que presentan scTCR adecuadamente plegado. La **figura 23B** muestra la correlación entre la expresión en superficie y la secreción soluble. Se compara el scTCR de superficie activo para 1B2 determinado mediante flujo con la actividad 1B2 del material soluble secretado mediante ensayo ELISA. Como mínimo, se realizaron experimentos de flujo por duplicado para determinar la media de unidades de fluorescencia de un clon concreto.

La **figura 24A** muestra las estabildades de temperatura de scTCR. Las muestras de sobrenadante de levadura que contenían scTCR se sometieron a las temperaturas indicadas durante una hora. Se analizaron las muestras por triplicado para determinar las fracciones activas para 1B2 mediante ELISA. Las fracciones se normalizaron de forma independiente a la unidad por la señal ELISA de mayor intensidad que no tenía pérdida de actividad. La **figura 24B** muestra la cinética de la desnaturalización térmica de scTCR. Actividad ELISA de 1B2 de las muestras de sobrenadante se monitorizó en función del tiempo. Cada muestra se incubó a 46°C. Se indican las velocidades de desnaturalización térmica cinética observadas (k_{obs}) a 46°C. En la **figura 24A** y en la **24B**, se realizan comparaciones para TRX-TCR más que scTCR de tipo silvestre porque no se detectó scTCR de tipo silvestre en los sobrenadantes de levadura.

La **figura 25** muestra la correlación entre la estabilidad térmica y la expresión soluble. Se compara la actividad ELISA de scTCR 1B2 que quedaba después de la incubación a 48°C durante una hora, con los niveles relativos de secreción (ELISA de 1B2). Se analizaron las muestras por triplicado para los niveles de secreción y para los análisis de desnaturalización térmica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "maduración de la afinidad" se refiere a un proceso de mutación y selección sucesiva por el cual se seleccionan los anticuerpos de mayor afinidad. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aglutinina" se refiere a una proteína de adhesión de la superficie de levaduras que une entre sí dos células de levadura durante el apareamiento. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína producida por los sistemas inmunitarios de mamíferos que se une firmemente y específicamente a moléculas concretas. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ligando" se refiere a una molécula a la que se une específicamente una proteína concreta. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a un ligando al que se une específicamente un anticuerpo. Tal

como se utiliza en el presente documento, la expresión "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a la porción de un anticuerpo que entra directamente en contacto con el antígeno unido. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "clasificación de células activadas por fluorescencia" o "citometría de flujo" se refiere a un método para clasificar poblaciones de células en base al marcado con fluorescencia diferencial. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hapteno" se refiere a un antígeno pequeño que no puede estimular una respuesta inmunitaria sin estar conjugado con un vehículo. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo monocatenario" o "SCA" se refiere a una fusión de porciones de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo que conserva un único sitio de unión activo. El término scFv se utiliza indistintamente para referirse a un anticuerpo monocatenario. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "epítipo de identificación" se refiere a una secuencia contigua de aminoácidos a la que se une específicamente un anticuerpo cuando está fusionada a otra proteína. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "HA" se refiere a la secuencia de epítipo de identificación YPYDVPDYA (SEC ID N° 1). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "c-myc" se refiere a la secuencia de epítipo de identificación EQKLISEEDL (SEC ID N° 2). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "scFv 4-4-20" se refiere a un scFv que se une específicamente a la fluoresceína y fluoresceína conjugada con otras moléculas tales como biotina o dextrano. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "AGA2p" se refiere al producto del gen de aglutinina a de tipo de apareamiento AGA2 de levadura. La expresión "capacidad de presentación" se utiliza para describir una combinación de características biofísicas que permiten que una proteína escape del aparato de "control de calidad" de la secreción que conserva y degrada las proteínas anómalamente plegadas (Hammond y Helenius, 1995.) Las proteínas presentadas en la superficie de la célula de levadura deben pasar primero con éxito por la etapa de control de calidad. Se cree que la estabilidad termodinámica y la cinética de plegamiento de las proteínas juntas determinan la eficacia para escapar del aparato de control de calidad.

Según la presente invención, pueden emplearse técnicas convencional de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas están explicadas con todo detalle en la literatura. Véanse, por ejemplo, Maniatis, Fritsch y Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)"; DNA Cloning: A Practical Approach", volúmenes I y II (D.N. Glover ed., 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984), "Nucleic Acid Hybridization" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); "Transcription and Translation" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984)); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed. (1986)); "Immobilized Cells And Enzymes" (IRL Press, (1986)); B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, bacteriófago o cósmido, al que puede fijarse otro segmento de ADN con el fin de provocar la replicación del segmento fijado.

Una "secuencia codificante" de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante vienen determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) terminal y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo) terminal. Una secuencia codificante puede incluir secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero) e incluso secuencias de ADN sintéticas. Por lo general habrá una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción en dirección 3' respecto a la secuencia codificante.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula hospedadora.

Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección 3'). A efectos descriptivos de la presente invención, la secuencia promotora está limitada en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende cadena arriba (dirección 5') hasta incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente mediante mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas suelen contener, aunque no siempre, cajas "TATA" y cajas "CAT". Los promotores procariotas contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias consenso -10 y -35.

Una "secuencia de control de la expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificante está "bajo el control" de las secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante a ARNm, que a continuación es traducida a la proteína codificada por la secuencia codificante.

Un "gen de selección" se refiere a un gen que permite distinguir las células que presentan un fenotipo necesario tras la aplicación de determinadas condiciones. Por ejemplo, el cultivo de bacterias en un medio que contiene antibióticos para seleccionar las células bacterianas que contienen genes de resistencia a antibióticos.

El término "cebador" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, esté

presente de manera natural como en una digestión con enzimas de restricción purificada o sea producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que ese induce la síntesis de un producto de extensión del cebador, que es complementario a una hebra de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser monocatenario o bicatenario y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluidos la temperatura, la fuente del cebador y el método utilizado. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico contiene por lo general 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

Los cebadores del presente documento se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarios a diferentes hebras de una secuencia concreta de ADN diana. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas hebras. Por lo tanto, la secuencia del cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, puede fijarse un fragmento de nucleótido no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementaria a la hebra. Como alternativa, pueden intercalarse en el cebador secuencias más largas o bases no complementarias, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia o hibride con ella y forme de ese modo el molde para la síntesis del producto de extensión.

Una célula se ha "transformado" mediante ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN se ha introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede estar integrado o no (unido covalentemente) en el genoma de la célula. En procariotas, levaduras y células de mamífero por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episomal tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada de manera estable es una en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de manera que será heredado por las células hijas a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Una región "heteróloga" del constructo de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de una molécula de ADN mayor que no se encuentra en asociación con la molécula mayor en la naturaleza. Por lo tanto, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará normalmente flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo de origen. En otro ejemplo, la secuencia codificante es un constructo en el que la secuencia codificante en sí no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc en el que la secuencia codificante genómica contiene intrones o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes de los del gen natural). Las variaciones alélicas o los acontecimientos mutacionales de origen natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN según se define en el presente documento.

Se conocen varias secuencias polipeptídicas que pueden fusionarse a proteínas y a las que se unen específicamente los anticuerpos y que pueden utilizarse como epítomos de identificación. Estas incluyen, por ejemplo, HA (SEC ID N° 1), c-myc (SEC ID N° 2), DTYRYI (SEC ID N° 3), TDFYLK (SEC ID N° 4), EEEEEYMPME (SEC ID N° 5), KPPTPPPEPET (SEC ID N° 6), HHHHHH (SEC ID N° 7), RYIRS (SEC ID N° 8) y DYKDDDDK (SEC ID N° 9).

Los anticuerpos son moléculas proteicas producidas por el sistema inmunitario humano para reconocer, unirse a e intervenir en la eliminación de sustancias extrañas del cuerpo. Se han desarrollado tecnologías para aprovechar los anticuerpos para un diagnóstico y tratamiento altamente específicos del cáncer. Por ejemplo, inmovilizando radioisótopos o toxinas a un anticuerpo que se une a las células tumorales, es posible suministrar una dosis orientada de tales agentes citotóxicos al tejido enfermo dejando el tejido circundante relativamente ileso. Los anticuerpos también son herramientas esenciales en biotecnología y son ampliamente utilizados para fines analíticos, por ejemplo, para cuantificar las cantidades traza de sustancias y separaciones, y para purificar productos biológicos deseados a partir de mezclas complejas.

En estas aplicaciones, son cruciales tanto la potencia de la unión del anticuerpo con su diana (afinidad) como la selectividad con la que un anticuerpo se une sólo a su diana concreta (especificidad). Por esta razón, los ingenieros de proteínas tratan de modificar y mejorar las características de unión de anticuerpos concretos. Los abordajes racionales para el diseño estructural de anticuerpos han tenido un éxito limitado y los métodos disponibles para el cribado aleatorio tienen limitaciones significativas.

El abordaje del problema del ajuste de la afinidad de los anticuerpos del sistema inmunitario de los mamíferos es mediante un proceso llamado "maduración de la afinidad", en el que ciclos de mutación y selección evolutiva producen anticuerpos que se unen a sus dianas con más potencia. La presente descripción proporciona un sistema nuevo y potente para diseñar la afinidad y la especificidad de los anticuerpos, construyendo un análogo microbiano del repertorio de linfocitos B del sistema inmunitario de los mamíferos. Los anticuerpos se presentan en la superficie de células de levadura mediante fusión genética con proteínas de la pared celular. Después de la mutación, se

seleccionaron variantes en base a la mejora de las características de unión con las dianas marcadas con fluorescencia.

5 Se ensayó el método de presentación de anticuerpos en levaduras estudiando anticuerpos modelo cuyas propiedades físicas y químicas ya están bien caracterizadas. A continuación, se aplican sencillamente estos métodos a los anticuerpos de interés práctico. Se combinan la maleabilidad genética de la levadura, la facilidad de cultivo de este microbio y la capacidad de modificar las condiciones de unión de los anticuerpos en el tubo de ensayo para producir un control sin precedentes sobre el diseño de la afinidad y especificidad del anticuerpo.

10 La ventaja del método de genoteca de la presente descripción es que es especialmente adecuado para proteínas tales como los anticuerpos. El método más ampliamente utilizado actualmente consiste en el "panning" de anticuerpos presentados en la superficie de bacteriófagos. La presentación en levaduras tiene varias ventajas frente a la presentación en bacteriófagos. En primer lugar, no es necesario romper la unión antígeno-anticuerpo para recuperar las variantes firmemente unidas. Las rigurosas condiciones necesarias para interrumpir esta unión en los
15 métodos de la técnica anterior pueden reducir la infectividad del bacteriófago. En segundo lugar, una mayor diversidad de la genoteca debida a la menor delección clonal es una ventaja. Es bien sabido que muchas estructuras de anticuerpos no pueden ser procesadas correctamente por el aparato secretor bacteriano. Las células de levadura son eucariotas y poseen vías de secreción muy similares a las células de mamífero. En tercer lugar, la presente descripción proporciona una determinación más exacta y precisa de la afinidad antígeno-anticuerpo. La presencia de
20 10^4 moléculas por célula elimina la variación estocástica que se obtiene con sólo unas pocas moléculas por bacteriófago. Por último, la cuantificación de la fluorescencia mediante citometría de flujo proporciona una medida continua de antígeno unido a la superficie sin un conocimiento *a priori* de la afinidad por comparación con la dicotomía binaria unido/liberado con el "panning" de bacteriófagos. Además, las bacterias poseen una capa de lipopolisacárido que hace de barrera de permeabilidad macromolecular impidiendo el acceso de anticuerpos o
25 proteínas a las moléculas presentadas.

La presente descripción proporciona un sistema de presentación en superficie para la expresión y la selección *in vitro* de genotecas de péptidos y proteínas en levaduras. Se ha fusionado un epítipo peptídico de nueve residuos (HA) a la subunidad de unión de una proteína de pared celular de levadura (AGA2), seguido del Fv monocatenario anti-fluoresceína de 4-4-20. La selección se realizó mediante citometría de flujo en mezclas de células con y sin la
30 fusión presentada. Se consiguieron enriquecimientos de 600 veces en un pase de clasificación. El sistema de la presente descripción ilustra un proceso para la maduración de la afinidad de anticuerpos *in vitro*, así como un proceso para la evolución dirigida de otras proteínas y péptidos, con las ventajas de (i) un esquema de selección por citometría de flujo con doble marcador que permite una mejor discriminación de la afinidad que el "panning"; (ii) hasta 10^4 copias de la secuencia presentada por célula, que elimina las variaciones estocásticas en la selección; y
35 (iii) la expresión de la genoteca en levaduras, con un sesgo de expresión modificado o potencialmente mejorado que podría producir clones que serían suprimidos de una genoteca expresada en *E. coli*.

Un objeto de la presente descripción es el diseño de anticuerpos para mejorar la afinidad y la especificidad.
40 Con este fin, se estudió la unión anticuerpo-hapteno a través de la mutagénesis y el cribado de anticuerpos expresados en la pared celular externa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Como eucariota experimentalmente fácil y genéticamente flexible, la levadura presenta ventajas significativas frente a la presentación en bacteriófagos filamentosos como plataforma para el diseño y la expresión de anticuerpos. En esencia, se construyó *in vitro* un análogo microbiano del repertorio de linfocitos B del sistema inmunitario de mamíferos, lo que permitió llevar a cabo la maduración de la afinidad de los anticuerpos en condiciones estrictamente controladas de
45 mutagénesis y selección. Como resultado, pudieron lograrse anticuerpos de afinidad y especificidad significativamente mejorada.

Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para seleccionar proteínas con propiedades de
50 unión deseables que comprende: transformar células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada en su extremo N-terminal a una proteína de unión de la pared celular de levadura; marcar la células de levadura con un primer marcador, en el que el primer marcador se asocia con las levaduras que expresan la proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan la proteína a ensayar; seleccionar las células de levadura con las que se asocia el primer marcador; cuantificar el primer marcador, en el que una gran presencia del
55 primer marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de unión deseables y en el que una baja presencia del primer marcador indica que la proteína a ensayar no tienen las propiedades de unión deseables.

Una forma realización preferente de la presente descripción incluye adicionalmente las etapas de: marcar las
60 células de levadura con un segundo marcador, en el que el segundo marcador se asocia con las levaduras que expresan un epítipo de identificación fusionado a la proteína a ensayar y codificado por el vector y no se asocia con las levaduras que no expresan el epítipo de identificación codificado por el vector; cuantificar el segundo marcador, en el que una presencia del segundo marcador indica un número de copias expresadas de la proteína marcada con el epítipo a ensayar en la superficie de la célula de levadura; y comparar la cuantificación del primer marcador con la cuantificación del segundo marcador para determinar la presencia del primer marcador normalizada a la presencia
65 del segundo marcador, en el que una gran presencia del primer marcador con respecto a la presencia del segundo marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de unión deseables.

Otra forma de realización preferente de la presente descripción incluye las etapas de: marcar las células de levadura con un tercer marcador que compite con el primer marcador por la unión a la proteína a ensayar; marcar las células de levadura con el primer marcador; cuantificar el primer marcador; marcar las células de levadura con el segundo marcador; cuantificar el segundo marcador; y comparar la cuantificación del primer marcador con la cuantificación del segundo marcador para determinar la presencia del primer marcador normalizada a la presencia del segundo marcador, en el que una baja presencia del primer marcador con respecto a la presencia del segundo marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de unión deseables.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un vector para llevar a cabo el método de la presente invención, que comprende una proteína de unión de pared celular fusionada a un extremo N-terminal de una proteína de interés. Las formas de realización preferentes de este aspecto de la presente descripción incluyen medios de expresión de un epítipo de identificación polipeptídico en las células de levadura. Una forma de realización más preferente proporciona que la proteína de unión de la pared celular es una subunidad de unión de proteína aglutinina de levadura, incluso más preferentemente, la proteína aglutinina de levadura es Aga2p.

La presente invención proporciona un método de selección de proteínas con propiedades fenotípicas mejoradas con respecto a las de la proteína de tipo silvestre, que comprende las etapas de: transformar células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada a una proteína de pared celular de levadura, en el que se utiliza la mutagénesis para generar una población variegada de mutantes de la proteína a ensayar; marcar las células de levadura con un primer marcador, en el que el primer marcador se asocia con las levaduras que expresan la proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan la proteína a ensayar; aislar las células de levadura con las que se asocia el primer marcador; y analizar y comparar las propiedades de la proteína mutante expresada por la levadura con propiedades de la proteína de tipo silvestre, en el que se seleccionan células de levadura que presentan proteínas mutantes con propiedades mejoradas frente a la proteína de tipo silvestre. Como se ha descrito anteriormente, con esta forma de realización puede emplearse un segundo y/o tercer marcador y la selección de las proteínas mutadas de interés con propiedades fenotípicas mejoradas puede implicar ciclos iterativos de las etapas de enriquecimiento y de marcado.

En formas de realización preferentes, la proteína de pared celular de levadura es una aglutinina; la proteína a ensayar está fusionada por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de una subunidad de unión de aglutinina; la cepa de levadura es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*; la proteína a ensayar es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo Fab, Fv o scFv, más preferentemente la proteína a ensayar es el dominio de unión a ligando de un receptor de superficie celular, incluso más preferentemente, el receptor de superficie celular es un receptor de linfocitos T.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para seleccionar proteínas mutantes que presentan propiedades fenotípicas mejoradas seleccionadas del grupo que consiste en la expresión en superficie, la estabilidad, el nivel de secreción y la solubilidad, en el que los mutantes de la proteína a ensayar pueden contener mutaciones individuales o mutaciones múltiples.

En otro aspecto más de la presente invención, puede utilizarse un segundo marcador para determinar cuantitativamente los niveles de expresión en la superficie celular, que pueden utilizarse como ensayo para seleccionar otras propiedades fenotípicas deseables, tales como la expresión intracelular, la estabilidad, la constante de unión, la constante de disociación, el nivel de secreción y la solubilidad.

Las proteínas mutantes seleccionadas mediante los métodos de la presente invención pueden caracterizarse adicionalmente clonando el gen que codifica las proteínas mutantes seleccionadas en un vector adaptado para la expresión en un eucariota; y expresando la proteína mutante en el eucariota, en el que las propiedades mejoradas de la proteína mutante se confirman comparando las propiedades fenotípicas de las propiedades mejoradas de la proteína mutante con las propiedades de la proteína de tipo silvestre. Preferentemente, el eucariota está seleccionado del grupo que consiste en mamíferos, insectos o levaduras. Debido a que el fenotipo del mutante seleccionado es una propiedad intrínseca de la "nueva" proteína (es decir, mutada), este abordaje también es aplicable a la expresión del mutante en otros sistemas de expresión no eucariotas.

Otro aspecto preferente de la presente invención proporciona un método para la presentación de proteínas que no presentan en forma de su secuencia normal ("de tipo silvestre"). En el ejemplo mostrado, el receptor de linfocitos T para el antígeno no se expresó en forma de su secuencia "de tipo silvestre". Sin embargo, después de la mutagénesis aleatoria y la selección mediante citometría de flujo con los anticuerpos específicos de conformación apropiados, los receptores mutantes se expresaron en la superficie de las células de levadura. Esta estrategia permitirá descubrir nuevos receptores de linfocitos T y proporciona un método para la presentación de prácticamente cualquier polipéptido. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para seleccionar proteínas por su capacidad de presentación en la superficie de una célula de levadura, que comprende las etapas de: transformar células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada a una proteína de pared celular de levadura, en el que se utiliza la mutagénesis para generar una población variegada de mutantes de la proteína a ensayar; marcar las células de levadura con un primer marcador, en el que el primer marcador se

asocia con las levaduras que expresan la proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan la proteína a ensayar; aislar las células de levadura con las que se asocia el primer marcador, cuantificando el primer marcador, en el que una gran presencia del primer marcador indica que la proteína a ensayar tiene las propiedades de presentación deseables y en el que una baja presencia del primer marcador indica que la proteína a ensayar no tiene las propiedades de presentación deseables. Preferentemente, la proteína ensayada es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo Fab, Fv o scFv, o el dominio de unión a ligando de un receptor de superficie celular. Un ejemplo representativo de un receptor de superficie celular es un receptor de linfocitos T.

Los siguientes ejemplos se dan con el fin de ilustrar diversas formas de realización de la invención y no pretenden limitar de ninguna manera la presente invención.

EJEMPLO 1

Medios/Tampones

En el presente documento se utilizan los siguientes medios/tampones:

E. coli

Medio LB (1X): triptona Bacto (Difco, Detroit, MI): 10,0 g; extracto de levadura Bacto (Difco): 5,0 g; NaCl: 10,0 g. Completar hasta 1 litro, esterilizar en autoclave. Para las placas, añadir 15 g/l de agar y esterilizar en autoclave.

Reserva de ampicilina: 25 mg/ml de sal sódica de ampicilina en agua. Esterilizar por filtración y almacenar en alícuotas de 4 ml a -20°C. [] de trabajo = 35 mg/ml-50 mg/ml; 4 ml de alícuota en 1 l → 100 mg/ml; 2 ml de alícuota en 1 l → 50 mg/ml. Añadir al autoclave LB sólo después de que se haya enfriado hasta ~ 55°C.

Medio SOC (100 ml): triptona Bacto al 2%: 2,0 g; extracto de levadura al 0,5% (Difco): 0,5 g; NaCl 10 mM: 0,2 ml 5 M; MgCl₂ 10 mM: 1,0 ml 1 M; MgSO₄ 10 mM: 1,0 ml 1M; Dextrosa 20 mM: 0,36 g. Esterilizar en autoclave o esterilizar por filtración.

Levadura

Mínimo sintético + casaminoácidos (SD-CAA)	500 ml
Dextrosa (Glucosa)	10,00 g
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)	3,35 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	5,1 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	4,28 g
Casaminoácidos (Trp-, Ura-) (Difco)	2,5 g

Añadir dH₂O hasta el volumen final. Esterilizar por filtración y refrigerar. Para las placas, disolver fosfatos de sodio y de sorbitol hasta una concentración final 1 M en 400 ml de dH₂O. Añadir 7,5 g de agar y esterilizar en autoclave. Disolver dextrosa, base nitrogenada y aminoácidos en 100 ml de dH₂O y esterilizar por filtración. Añadir los reactivos filtrados después que las sales esterilizadas en autoclave se hayan enfriado lo suficiente como para tocarlas.

SG-CAA (medio de inducción)	500 ml
Galactosa	10,00 g
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)	3,35 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	5,1 g
NaH ₂ P ₄ O ₄ · H ₂ O	4,28 g
Casaminoácidos (Trp-, Ura-) (Difco)	2,5 g

Añadir dH₂O hasta el volumen final. Esterilizar por filtración y refrigerar.

Enriquecido (YPD) (1000 ml): Extracto de levadura: 10 g; peptona (Difco): 20 g; Dextrosa: 20 g. Añadir dH₂O hasta 1 l. Esterilizar en autoclave.

TAE (Tris-acetato): Solución de trabajo: Tris-acetato 0,04 M y EDTA 0,001 M

Reserva (50X):	<u>en 1 l</u>
Base Tris	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml

TBE (Tris-borato): Solución de trabajo: Tris-borato 0,09 M y EDTA 0,001 M

5	Reserva (5X):	<u>en 1 l</u>
	Base Tris	54 g
	Ácido bórico	27,5 g
	EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20,0 ml

10 Tampón de parada 10X (Restricción): glicerol al 50% v/v; EDTA 0,1 M (pH 7,5); SDS al 1% p/v; azul de bromofenol al 0,1% p/v. Combinar todos los componentes excepto el colorante y ajustar el pH a 7,5 antes de añadir el colorante.
Tinción -- bromuro de etidio: 0,5 mg/ml en agua; Reserva: 10 mg/ml. Diluciones de reserva: 1/10 en TBE. Añadir 100 ml de dilución en 100 ml de tampón.

Solución de trabajo TBS: Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM y EDTA 5 mM. Esterilizar por filtración.

15 EJEMPLO 2

Protocolo: réplica en placa

- 20 1. Elegir un material adecuado para las transferencias de colonias, asegurándose de que está lavado, seco y estéril.
2. Marcar el fondo de cada placa de réplica nueva con una flecha para alinear la placa. Marcar también la placa de partida.
- 25 3. Quitar la tapa de la placa de partida, colocarla boca abajo y alinear la flecha del fondo con la marca en el material de transferencia de colonias. Depositar la placa en la superficie del material y presionar suavemente sobre toda la placa. Verificar de que la placa no se mueva después de que haya tocado el material. Retirar la placa y volver a colocar la tapa. Pueden verse las porciones de las colonias que se han transferido al material.
- 30 4. Repetir este procedimiento con una de las placas de réplica nuevas. Verificar que la flecha coincida con la marca también para hacer una réplica exacta. Mantener a la luz para ver las diminutas colonias que se han transferido.
5. Repetir todo el procedimiento para cada placa de réplica a realizar.
6. Incubar las placas de réplica en las condiciones apropiadas para el cultivo selectivo. Las colonias suelen crecer en de uno o dos días.

35 EJEMPLO 3

Protocolo: electrotransformación de levaduras

Preparación de células:

- 40 1. Inocular 50 ml de YPD con un cultivo de una noche hasta una DO de 0,1.
2. Cultivar las células a 30°C con agitación vigorosa hasta una DO_{600} de 1,3 a 1,5 (aproximadamente 6 horas).
- 45 3. Recoger en rotor frío a 3.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Desechar el sobrenadante.
4. Lavar bien las células mediante resuspensión en 50 ml de agua estéril fría. Centrifugar como antes y desechar el sobrenadante.
5. Repetir la etapa 4 con 25 ml de agua fría.
6. Resuspender en 2 ml de sorbitol 1 M estéril enfriado en hielo. Centrifugar como antes y desechar el sobrenadante.
- 50 7. Resuspender en 50 ml de sorbitol 1 M enfriado en hielo. El volumen final de células es de aproximadamente 150 ml (suficiente para 3 transformaciones).

Electrotransformación:

- 55 1. Colocar las cubetas de 0,2 cm y la cámara de portaobjetos blanca en hielo.
2. En un tubo Eppendorf, añadir 50 ml de suspensión de levadura y mezclar suavemente en < 5 ml (0,1 mg) de ADN de plásmido en TE. Verificar que el ADN se añade a la levadura ya en el Eppendorf. Colocar sobre hielo durante 5 minutos (Este período de tiempo es bastante crítico).
- 60 3. Ajustar el GENE PULSER a 1,5 kV y 25 mF. Ajustar el controlador de pulsos a 200 W. La constante de tiempo para este pulso debe ser de 4,5 ms a 5,0 ms.
4. Transferir 40 ml de mezcla de células/ADN a la cubeta de electroporación previamente enfriada. Golpear suavemente el contenido hasta que llegue al fondo, verificando que la muestra quede en contacto con ambos laterales de aluminio de la cubeta. Colocar la cubeta en el portaobjetos de cámara de seguridad refrigerado. Empujar el portaobjetos en la cámara hasta que la cubeta entre en contacto con los electrodos en la base de la cámara.
- 65 5. Aplicar un pulso a los ajustes anteriormente indicados.

6. Retirar el portaobjetos con la cubeta y añadir inmediatamente a la cubeta 1 ml de sorbitol 1 M frío. Mezclar y devolver la cubeta al hielo. Extender 200 ml en placas selectivas que contienen sorbitol 1 M.

EJEMPLO 4

- 5 **Protocolo: transformación de *E. coli***
- 10 1. Descongelar una alícuota de HB101 competente en cuanto a eficacia de subclonación (-70°C de almacenamiento) en hielo, manteniendo todos los reactivos en hielo. Utilizar células DH5α para la complementación de lac z; DM-1 para ausencia de metilación.
 - 15 2. Distribuir 50 ml de HB101 en el número necesario de tubos Eppendorf, uno para cada muestra de ADN, uno para pBR322 (testigo positivo) (pUC19 para DH5α y DM-1), uno sin ADN (testigo negativo).
 3. Alícuotar las células no utilizadas en porciones de 50 ml y congelar de nuevo en un baño de hielo/EtOH seco; almacenar a -70°C.
 4. Añadir 1 ml de ADN (1 mg) a los tubos Eppendorf (1 ml de pBR322 o pUC19), golpear suavemente los tubos para mezclar, a continuación incubar en hielo durante 30 minutos. Para las ligaciones, utilizar 1-2 ml de mezcla de ligación (en exceso, deteriora la transformación).
 5. Choque térmico a 37°C durante 20 segundos. (45 segundos a 42°C para las células DM-1).
 6. Colocar en hielo durante 2 minutos, a continuación añadir 0,95 ml de medio SOC a temperatura ambiente. Incubar a 37°C durante 1 hora en un baño (agitación opcional) o en un agitador en una sala a 37°C.
 7. Sembrar 100-200 ml de células sobre LB, 100 mg/ml de ampicilina e incubar durante toda la noche a 37°C.

EJEMPLO 5

- 25 **Protocolo: Purificación de ADN con GELase®**
- La preparación Wizard® PCR (Promega; Madison, WI) es un protocolo alternativo para purificar ADN a partir de un gel. Se recomienda GELase® si el rendimiento de la preparación Wizard® es bajo. Los bajos rendimientos se dan si los fragmentos deseados tienen una longitud inferior a 200 kb o superior a 5 kb.
- 30 1. Separar los fragmentos de ADN sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en tampón 1x TAE de nueva aportación.
 2. Teñir el gel con bromuro de etidio en agua. Utilizar la lámpara UV de mano, recortar los fragmentos de interés con una hoja de afeitar nueva.
 - 35 3. Colocar el corte de gel en un tubo Eppendorf previamente pesado. Pesar de nuevo los dos para determinar el peso del corte de gel. Si el peso del corte de gel es superior a 300 mg, dividir las muestras en dos tubos después de la etapa 6.
 4. Añadir 2 ml de tampón 50x GELase® por cada 100 mg de corte de gel.
 - 40 5. Incubar el tubo que contiene el corte de gel a 70°C hasta que el gel esté completamente fundido. Esto llevará al menos 20 minutos. Una buena técnica es esperar 30 minutos, pipetear la mezcla arriba y abajo un par de veces, y a continuación esperar otros 10 minutos. Verificar que gel esté completamente fundido.
 6. Equilibrar el gel fundido a 45°C durante al menos 30 minutos.
 7. Añadir 1 U de GELase® por cada 150 mg de agarosa fundida. Incubar durante 4 horas. Para > 600 mg, añadir 2 U de GELase®.
 - 45 8. Añadir a la solución 1 volumen (1 volumen = mg de corte de gel) de acetato de amonio 5 M. Si se utilizan > 300 mg de gel, se necesita un tubo más grande para la precipitación con etanol.
 9. Añadir 2 volúmenes (1 volumen = mg de corte de gel + acetato de amonio) de etanol al 100% a temperatura ambiente e invertir varias veces.
 - 50 10. Sedimentar el ADN mediante centrifugación durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente en 19 RAL. Si la concentración de ADN es muy baja, esperar 30 minutos después de añadir el etanol y a continuación centrifugar durante 30 minutos.
 11. Aspirar el sobrenadante con una pipeta y desechar.
 12. Lavar el sedimento con etanol al 70% a temperatura ambiente.
 - 55 13. Disolver el ADN en agua o TE. A continuación puede almacenarse el ADN a -20°C.

EJEMPLO 6

Protocolo: Ligación

- 60 **Materiales:** ADN ligasa de T4 y 2x tampón de ADN ligasa de T4
 Para la fosfatación: fosfatasa intestinal de ternero (CIP) y tampón (de ser necesario). Para la generación de extremos romos: mezcla de dNTP (0,5 mM). Fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* o la ADN polimerasa de T4. Para la unión: conectores oligonucleótido- DTT 0,2 mM.
- 65 1. En una mezcla de reacción de 20 ml, escindir los componentes individuales del ADN con la endonucleasa de restricción apropiada. Una vez finalizada la reacción, inactivar las enzimas calentando 15 minutos a 65°C.

Si no se necesitan tratamientos enzimáticos adicionales, pasar a la etapa 6.

2. Si se van a eliminar los fosfatos 5' de uno de los ADN, añadir 2 ml de 10X tampón CIP y CIP 1 U; incubar de 30 a 60 minutos a 37°C. Una vez finalizada la reacción, inactivar el CIP por calentamiento de 15 minutos a 75°C. Si no se necesitan tratamientos enzimáticos adicionales, pasar a la etapa 6.

3. Para la generación de extremos romos, añadir 1 ml de una solución que contiene los 4 dNTP (0,5 mM cada uno) y una cantidad apropiada del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* o la ADN polimerasa de T4; llevar a cabo la reacción de rellenado o recorte. Una vez finalizada, inactivar las enzimas por calentamiento de 15 minutos a 75°C. Si van a añadirse conectores oligonucleótido, pasar a la etapa 4. Si se desea un fragmento de ADN que contenga sólo un extremo romo, escindir los productos de reacción con una endonucleasa de restricción apropiada. Si no se necesitan tratamientos enzimáticos adicionales, pasar a la etapa 6.

4. Añadir de 0,1 mg a 1,0 mg de un conector oligonucleótido apropiado, 1 ml de ATP 10 mM, 1 ml de DTT 0,2 M y de 20 a 100 unidades de extremos cohesivos de ADN ligasa de T4; incubar durante toda la noche a 15°C. Inactivar la ligasa por calentamiento de 15 minutos a 75°C.

5. Escindir los productos de la etapa 4 con la enzima de restricción que reconoce el conector oligonucleótido, ajustar las condiciones de tampón, de ser necesario. Si sólo uno de los dos extremos va a contener un conector, escindir los productos con una enzima de restricción adicional.

6. Aislar los segmentos de ADN deseados mediante electroforesis en gel, de ser necesario. A continuación, purificar (GeneClean II[®] o GELase[®]).

7. Ligación: 9 ml de los ADN constitutivos (de 0,1 mg a 5 mg), 4 ml de tampón de ligasa 5x, 1 ml (extremo cohesivo) de ADN ligasa de T4 (BRL: 1 unidad = 300 unidades de extremos cohesivos, necesitan de 20 a 500 unidades de extremos cohesivos), añadir agua hasta 20 ml. Incubar de 1 a 24 horas a 16°C.

8. Introducir 1 ml de los productos ligados en células competentes de *E. coli* y seleccionar los transformantes. A continuación, realizar una minipreparación y el mapeo de restricción para cribar en busca del producto deseado.

EJEMPLO 7

Clonación:

Todas las transformaciones se dieron en la cepa de *E. coli* DH5α siguiendo el protocolo del fabricante.

PCR

- PCR de arranque en caliente utilizando Ampliwax PCR gem (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT) - protocolo del fabricante para tubos de paredes delgadas.
- Kit GeneAmp PCR Core Reagents (Perkin-Elmer-Cetus)
- Equipo DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer-Cetus)

AGA2

Clonado mediante PCR.

- El molde para la PCR fue la genoteca de ADN de *S. cerevisiae* del GEN BANK (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD).
- Cebadores: 5'-ATTAGAATTCCCTACTTCATACATTTTCAA-3' (SEC ID N° 10) y 5'-ATTACTCGAGCTATTACTGCAGagcgtagtctggaacgtcgtatgggtaAAAAACATACT GTGTGTTTATGGG-3' (SEC ID N° 11).
- Perfil térmico:

Desnaturalización: 1 minuto a 94°C

Hibridación: 2 minutos a 41°C (primeros 5 ciclos), 2 minutos a 45°C (25 ciclos adicionales)

Extensión: 25 segundos a 72°C

Etapa final de formación de extremos romos: 10 minutos a 72°C

Se clonó el producto de la PCR en el plásmido pCR-Script utilizando el kit PCR-Script SK(+) Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se escindió el fragmento de AGA2 de 342 pb con *EcoRI* y *XhoI*, se purificó sobre un gel de agarosa al 1% (protocolo 6.1.7.2) y se subclonó en el pCR-Script que contenía el promotor CUP 1 como un fragmento *KpnI/EcoRI*.

Péptido HA

Se insertó el péptido HA mediante mutagénesis de casete. Se sintetizaron hebras de oligonucleótidos complementarios que codificaban la secuencia de reconocimiento del Factor Xa y el epítipo HA con protuberancias cohesivas permitiendo la ligación al sitio *XhoI* en 3' del clon AGA2, destruyendo al mismo tiempo este sitio; un sitio

SacI cadena abajo en el pCR-Script hibridado y ligado al constructo CUP1-AGA2 en el pCR-Script. El inserto incluía un nuevo sitio *XhoI* en el extremo 3' de la secuencia de HA. Se escindió CUP1-AGA2-HA como un fragmento *KpnI/XhoI*, se purificó en un gel de agarosa al 1% y se subclonó en el vector lanzadera de levadura pRS314 (1) que ya que contenía la secuencia terminadora del factor alfa, para formar el vector de presentación en superficie pCT101.

Secuencias de oligonucleótidos:
 5'-TCGACGATTGAAGGTAGATACCCATACGACGTTCCAGACTACGCTCTG CAGTAATAGATTATCCTCGAGCT-3'
 (SEC ID N° 12) y 5'-CGAGGATAATCTATTACTGCAGAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGGT
 ATCTACCTTCAATCG-3' (SEC ID N° 13).

Se escindió el promotor GAL del vector YCplac22-GAL. En primer lugar, se clonaron en este vector conectores palindrómicos de 12 pb con protuberancias cohesivas apropiados para modificar los sitios de restricción en ambos extremos: *EcoRI* → *KpnI* (E/KLINK) y *BamHI* → *EcoRI* (B/ELINK). El fragmento *KpnI/EcoRI* resultante se clonó en el pCT101 para formar el vector pCT201. Secuencias de oligonucleótidos: E/LLINK 5'-AATTGGTACC-3' (SEC ID N° 14); B/ELINK 5'-GATCGAATTC-3' (SEC ID N° 15).

Se amplificó el 4-4-20 scFv mediante PCR como se ha indicado anteriormente:

- Molde: 4-4-20 en el vector GenX (obtenido de D. Kranz, Departamento de Bioquímica de la UIUC).
- Cebadores: 5'-ggtggccaagctagcGACGTCGTTATGACTCAA-3' (SEC ID N° 16) y
 5'-ggccggccaactcgagctattacaagctcttccagaaataagctttgttcTGAGGAGACGGTGACTGA-3' (SEC ID N° 17).
- Perfil térmico:

Desnaturalización: 1 minuto a 94°C
 Hibridación: 2 minutos a 40°C (primeros 5 ciclos), 2 minutos a 48°C (30 ciclos adicionales)
 Extensión: 50 segundos a 72°C
 Etapa final de formación de extremos romos: 10 minutos a 72°C

Se clonó el producto de la PCR en el pCR-Script y se subclonó en el pCT201 como un fragmento *NheI/XhoI* utilizando los métodos anteriormente indicados, crando el vector pCT202. Se creó el vector pCT302 insertando un oligonucleótido sintético (Centro de Biotecnología de la UIUC) que codificaba un conector (Gly₄-Ser)₃ en el marco entre los marcos de lectura abiertos 4-4-20 y AGA2 de pCT202.

AGA1

Amplificado mediante PCR como se ha indicado anteriormente:

- Molde: CEN BANK
- Cebadores: 5'-ATTAGAATTCAGCTAAAAAACCACAAAAAT-3' (SEQ ID N° 18) y
 5'-ATTAATCGAGctTAACTGAAAATTACATTGC-3' (SEQ ID N° 19).
- Perfil térmico:

Desnaturalización: 1 minuto a 94°C
 Hibridación: 2 minutos a 41°C (primeros 5 ciclos), 2 minutos a 45°C (25 ciclos adicionales)
 Extensión: 2 minutos, 20 segundos a 72°C
 Etapa final de formación de extremos romos: 10 minutos a 72°C

Se purificó el producto de la PCR en gel utilizando el kit GELase[®]. Se clonó el fragmento *KpnI/SstI* de pCT201 en el vector pRS316. A continuación, éste se digirió con *EcoRI* y *XhoI*, el fragmento AGA2 cortado se eliminó mediante purificación en gel del fragmento de vector restante y se ligó al producto de PCR AGA1 purificado digerido con *EcoRI* y *XhoI*. El clon resultante fue el pCT211. Posteriormente se clonó el fragmento *KpnI/SstI* de pCT211 en el vector Ylplac211 para formar vector pIU211.

EJEMPLO 8

Expresión en levaduras

Cepa de levadura *S. cerevisiae* BJ5465 (a ura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4:His2 prb1D1.6R can GAL). Esta cepa es un mutante pep4 y prb1, por lo que es deficiente en proteasas. Se han suprimido tres marcadores nutricionales y puede utilizarse para la selección de plásmidos: URA3, TRP1 y LEU2. Se ha delecionado HIS3, pero la deleción de PEP4 está cubierta con un marcador HIS.

Transformación:

Se cortó el vector pIU211 con BsiWI lo que se produce únicamente dentro de la secuencia AGA1. Se transformaron simultáneamente aproximadamente 100 ng de este vector linealizado y 200 ng de pCT202 en la cepa

de levadura BJ5465 mediante electroporación (protocolo 2.6.1). Los transformantes se seleccionan en placas SD-CAA.

Condiciones experimentales de inducción:

Se inoculó una única colonia de levadura transformada con pLU211 y pCT202 en 3 ml de SD-CAA y se cultivó ~ 24 horas a 30°C. La densidad celular en este instante era $\sim 10^7$ - 10^8 células/ml (es decir, $DO_{600} \sim 1$ -3). Se recogieron mediante centrifugación células suficientes para inocular 3 ml de SG-CAA a DO_{600} inicial de $\sim 0,5$. Se hizo crecer este cultivo ~ 20 horas a 30°C.

EJEMPLO 9

Marcado con fluorescencia de células de levadura

Se utilizó el siguiente método para el marcado con fluorescencia de células de levadura:

1. Recoger 0,2 OD-ml (a 600 nm) de las células después del cultivo durante 20 horas en SG-CAA mediante centrifugación durante ~ 10 -30 segundos a 14.000 g.
2. Lavar el sedimento celular mediante resuspensión en TBS y centrifugación.
3. Resuspender el sedimento en un volumen apropiado de TBS para generar un volumen final de 100 ml para la incubación. Agregar las siguientes cantidades de reactivos de marcado, según proceda: 1 ml de 25 mg/ml de FITC-dextrano (PM 2.000.000) (Sigma); 1 ml de líquido ascítico con AcMo 9E10 (Babco) o 10 ml de 9E10 a 100 mg/ml (Santa Cruz Biotechnology); 100 ml de AcMo 12CA5 (Boehringer-Mannheim) a 10 mg/ml en TBS. Mezclar mediante agitación vorticial o pipeteando arriba y abajo.
4. Incubar 1 hora a temperatura ambiente, mezclando las células aproximadamente cada 20 minutos agitando el tubo, mediante agitación vorticial o pipeteando.
5. Centrifugar las células y resuspender en un volumen apropiado de TBS para generar 100 ml de volumen final. Añadir los reactivos secundarios según corresponda en las siguientes cantidades: 4 ml de α -ratón-PE (Sigma); 2 ml de α -ratón-FITC (Sigma); 1 ml de FITC-dextrano.
6. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar y lavar como en la etapa 2.
8. Resuspender el sedimento en 100 \sim ml de base Tris 10 mM, pH 8,3 (para cualquier cosa marcada con FITC) o TBS para la microscopía. Para la citometría de flujo, resuspender en 500 ml de Tris 10 mM (densidad celular final $\sim 10^6$ /ml o más). Las muestras tienen que estar en tubos de microcentrífuga de 0,5 ml para la citometría de flujo. Para los experimentos que utilizan biotina-fluoresceína, las células se cultivaron, se indujeron, se recogieron y se marcaron como se ha descrito con biotina-fluoresceína 10 mM en lugar de FITC-dextrano como marcador primario y una mezcla de 3 mg de estreptavidina-PE y 1 mg de $F(ab')_2$ de cabra anti-ratón conjugado con RED613 (Life Technologies, Grand Island, NY) como reactivos secundarios de marcado.

EJEMPLO 10

Microscopía de fluorescencia confocal

Se cultivaron la levadura que contenía el plásmido que dirige la expresión en superficie del péptido HA (pCT201) o la fusión scFv (pCT202) durante 20 horas en medio que contenía galactosa al 2% como única fuente de carbono y posteriormente se marcaron con el AcMo 9E10, seguido de un conjugado secundario IgG anti-ratón-R-ficoeritrina (PE) y FITC-dextrano, como se ha descrito. Se montaron las células marcadas en portaobjetos recubiertos con polilisina en medio de montaje glicerol al 90% que contenía 1 mg/ml de p-fenilendiamina como reactivo anti-decoloración y se analizaron con un microscopio confocal de barrido láser (UIUC Beckman Institute Microscopy Suite) a una velocidad de 8 segundos con un objetivo de 63 aumentos. Se recogieron imágenes de DIC, de fluorescencia roja de PE y de fluorescencia verde de FITC.

EJEMPLO 11

Clasificación y análisis mediante citometría de flujo

Se analizaron las suspensiones de células de levadura marcadas en un citómetro de flujo Coulter Epics XL en el Flow Cytometry Center del Centro de Biotecnología de la UIUC. La tasa de acontecimientos se mantuvo cercana a 500 células/segundo. La población se sometió a selección mediante dispersión de luz para evitar el examen de los agregados celulares y se recogieron los datos de 100 mil acontecimientos. Para los experimentos iniciales de clasificación celular, se mezcló la levadura que portaba el vector pCT202 con la cepa original sin transformar BJ5465 y se clasificaron en base a la señal de FITC en un banco de trabajo de clasificación de células Coulter 753 modificado con la electrónica de clasificación CICERO (UIUC Flow Cytometry Center). Se sembraron las muestras preclasificadas y clasificadas en medio no selectivo, a continuación se realizó la réplica en placa en medio selectivo para el vector pCT202. Se determinó la pureza como la fracción de colonias no selectivas que eran viables en las

placas selectivas.

EJEMPLO 12

5 **Quantificación del nivel de expresión de anticuerpos en superficie**

10 Se marcaron células que portaban el vector pCT202 y perlas Quantum Simply Cellular (Sigma, St. Louis, MO), con AcMo 12CA5 conjugado con FITC (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) a 10 g/ml en TBS como se ha escrito y se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics XL. La comparación de la intensidad de fluorescencia de la muestra de levadura con las perlas convencionales permitió determinar la capacidad de unión del anticuerpo de las células de levadura de presentación mediante regresión lineal utilizando QuickCal para Quantum Simply Cellular (Sigma).

EJEMPLO 13

15 **Análisis cinético de disociación del antígeno a partir de células que presentan scFv.**

20 Se cultivaron células de levadura que portaban el plásmido pCT202 y se marcaron con AcMo anti-c-myc 9E10 y FITC-dextrano o biotina-fluoresceína, como se ha descrito anteriormente. Se analizó mediante citometría de flujo una fracción de la población marcada para determinar el nivel inicial de fluorescencia. Se añadió un competidor no fluorescente (5-aminofluoresceína) a una concentración final de aproximadamente 10 mM (una cantidad ~ 1.000 veces superior) y se siguió la fluorescencia FITC o PE de la población de células positivas para c-myc en función del tiempo a temperatura ambiente (21°C-23°C) en un Coulter Epics XL. Los datos se ajustaron como un decaimiento exponencial. La probabilidad de que un antígeno polivalente esté unido a la célula en función del tiempo se da mediante $P = 1 - (1 - e^{-kt})^N$, en el que N es la valencia, k es la constante de velocidad cinética para la disociación y t es tiempo. Para una t grande, esto se reduce a $P = Ne^{kt}$. Por lo tanto, extrapolación de los datos de t grande al instante cero se obtiene $P = N$, o una intensidad de fluorescencia de $F_{ext} = N F_o$, en el que F_{ext} es la fluorescencia extrapolada en el momento de la adición del competidor y F_o es la fluorescencia inicial real. Por lo tanto, la valencia de la interacción del scFv 4-4-20 presentado en superficie y FITC-dextrano polivalente se determinó como la intersección y de las curvas de la figura 11.

35 Se ensayó la unión a fluoresceína soluble (FDS) observando la extinción de la fluorescencia por las células enteras que presentaban scFv. Se suspendieron las células a 2×10^7 células/ml en TBS + BSA al 0,1% en una cubeta de cuarzo termostatazada a 23°C y se titularon con FDS en un intervalo de 0 nM-7,5 nM. Se observó la fluorescencia a 520 nm con un espectrofluorómetro SLM Aminco SPF-500 utilizando 488 nm de excitación. Se titularon las células testigo que presentaban un scFv irrelevante para obtener una pendiente para un ajuste de dos parámetros de un modelo de unión en equilibrio a los datos, produciendo las constantes de equilibrio y las concentraciones de scFv efectivas. Después de la titulación de equilibrio, se añadió 5-aminofluoresceína a 1 mM y se siguió el cambio de fluorescencia de la muestra en el tiempo para determinar la K_{off} para FDS.

EJEMPLO 14

40 **Mutagénesis del gen de scFv**

45 Se transformaron por duplicado aproximadamente 100 ng de pCT302 en la cepa de *E. coli* XL1-Red (Stratagene, La Jolla, CA) según el protocolo del fabricante. Al cabo de 1 hora de inducción en medio SOC, se combinaron los dos grupos transformantes y se sembró 1/2.000 de la combinación en medio LB que contenía 100 mg/ml de ampicilina para determinar la eficacia de transformación. Se inocularon 5 ml de medio LB líquido que contenía 50 mg/ml de ampicilina más 100 mg/ml de carbenicilina (LB-AMP50-CARB100), con el resto de los transformantes y se cultivaron durante toda la noche a 37°C ($DO_{600} \sim 1,0$). Se recogió un volumen suficiente de este cultivo para inocular 50 ml de LB-AMP50-CARB100 a $DO_{600} = 0,01$ en un matraz agitador con deflector y se cultivó hasta una $DO_{600} \sim 1,0-1,1$ a 37°C. Se recogieron las células mediante centrifugación y se utilizaron para inocular 200 ml de LB-AMP50-CARB100 a $DO_{600} = 0,001$ y el cultivo se hizo crecer a 37°C hasta una $DO_{600} \sim 1,0$. Se aisló el ADN del plásmido mediante el kit QIAGEN® Maxiprep (QIAGEN®, Santa Clarita, CA). Se transformó el ADN recuperado en XL1-Red y se repitió tres veces el ciclo de crecimiento, lo que produjo un producto final sometido a aproximadamente 90 generaciones de crecimiento en la cepa mutágena.

EJEMPLO 15

60 **Expresión de la genoteca y cribado cinético**

65 Se transformaron 50 mg de ADN de pCT302 mutagenizado en la cepa de levadura EBY100 mediante el método de Gietz y Schiestl en diez reacciones separadas. Se combinaron los productos y se sembró 1/2.000 del total en medio selectivo para determinar el número total de transformantes. El resto se inoculó en 50 ml de medio selectivo con glucosa, se cultivó toda la noche a 30°C, se sometió a pases hasta una $DO_{600} = 0,1$ y se expandió 10 veces. Se inoculó medio con galactosa selectivo (5 ml) hasta una $DO_{600} = 0,5$ y se cultivó durante toda la noche a

30°C hasta una $DO_{600} = 1,0-2,0$. Se marcaron muestras de 10^7 células (1 DO_{600} -ml) con FITC-dextrano como se ha descrito anteriormente. Después del marcado, se resuspendieron las células en 5-aminofluoresceína 10 mM y AcMo 9E10 a temperatura ambiente durante 20 minutos, momento en el que se aclararon las muestras con tampón enfriado con hielo para detener la disociación competitiva del FITC-dextrano y se marcaron con anticuerpo secundario anti-ratón-PE como se ha descrito anteriormente. Se clasificaron las muestras en un banco de trabajo Coulter 753 con una ventana de clasificación como se muestra en la figura 4 y una tasa de acontecimientos de 4.000/segundo. Se examinaron 6×10^7 células durante la ronda de clasificación 1 y la ventana se fijó para recoger el 0,2% de la población. Las células recogidas se volvieron a cultivar en medio con glucosa y se cambiaron a galactosa como se ha descrito antes de repetir la competencia y la clasificación. Se realizaron un total de cuatro rondas de clasificación y amplificación. Se examinaron 4×10^7 células en la ronda 2 y 2×10^7 células en cada una de las rondas 3 y 4. Las rondas 1 y 2 se llevaron a cabo en modo de enriquecimiento para proporcionar una elevada recuperación de todos los clones positivos y las rondas 3 y 4 se llevaron a cabo en modo de purificación para rechazar las células negativas coincidentes y conseguir factores de enriquecimiento mayores. Se sembraron los productos de la ronda 4 para aislar clones individuales.

EJEMPLO 16

Establecimiento del sistema de presentación de fusiones

Se ha construido una fusión de un gen que codifica un epítipo de identificación peptídico con una proteína de pared celular de levadura y se ha verificado la expresión en superficie del epítipo. Esta proteína de la pared celular, α -aglutinina, está implicada en la adhesión célula-célula durante el apareamiento de la levadura y por lo tanto está expuesta en la superficie celular externa como receptor para las aglutininas en células de tipo de apareamiento opuesto. Se realizaron experimentos de ensayo de mezcla y clasificación para determinar los rendimientos de la purificación en un solo pase y en dos pases y la pureza para el cribado de afinidad mediante citometría de flujo.

EJEMPLO 17

Aglutininas de apareamiento de levaduras

En el ciclo vital de la levadura, las células haploides se producen como uno de dos posibles tipos de apareamiento, a o α . Cuando una célula haploide a y una célula haploide α entran en contacto físico, se adhieren entre sí a través de interacciones fuertes y específicas entre unas proteínas de adhesión de superficie celular denominadas "aglutininas". Una vez unidas de esta manera, las células se fusionan para formar una célula diploide. Como plataforma para la presentación de anticuerpos en la pared celular de levadura, se construyeron fusiones de polipéptidos a una subunidad de α -aglutinina. Dado que el papel fisiológico de las aglutininas es presentar los sitios de unión de la proteína en el exterior de la célula para una interacción específica y de alta afinidad con otras proteínas, el impedimento estérico artefactual por componentes de la pared de células de levadura fue mínima.

Como eucariota, la levadura posee un aparato secretor que es altamente homólogo al de los linfocitos B secretores de anticuerpos. Como resultado, la secreción ineficaz dependiente de clon artefactual debe reducirse al mínimo con este hospedador. Numerosos estudios han revelado una sorprendente homología entre las rutas secretoras de mamíferos y de levadura, de manera que pueden intercambiarse moléculas concretas sin pérdida significativa de la función, tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión de Bip de ratón sustituye funcionalmente la Bip de levadura, cuya expresión es esencial para el crecimiento (Normington, 1989). La expresión de PDI de mamífero sustituye funcionalmente la PDI de levadura, otra proteína luminal ER de levadura esencial (Gunther *et al.*, 1993). Dadas las grandes similitudes entre la secreción de levadura y de mamífero, la variabilidad clonal en la expresión de anticuerpos debida a un plegamiento anómalo debería ser sustancialmente reducida en levaduras, en comparación con los huéspedes bacterianos. De hecho, se ha demostrado anteriormente el plegamiento, ensamblaje y secreción de anticuerpos activos en levaduras (Wood *et al.*, '85; Horwitz *et al.*, '88).

La α -aglutinina de levadura se sintetiza como dos subunidades: Aga1p, que posee una cola de fosfatidil-inositol-glicano para el anclaje a la pared celular y Aga2p, que se une a la α -aglutinina con alta afinidad ($K_D \approx 1$ nM) (Lipke y Kurjan, 1992). Aga1p y Aga2p están unidas por enlaces disulfuro intersubunitarios y Aga2p se libera al medio de cultivo después de incubación con reductores tales como DTT. Aunque las colas de fosfatidil-inositol-glicano se localizan generalmente en una membrana, se han acumulado pruebas concluyentes de que Aga1p se une al glucano fibroso de la pared celular mediante transglicosilación (de Nobel y Lipke, 1994).

EJEMPLO 18

Construcción de la fusión

Con el fin de establecer la viabilidad del uso de fusiones de aglutinina para la presenciación de polipéptidos en la superficie de la célula de levadura, en primer lugar se fusionó genéticamente a Aga2p un péptido "epítipo de identificación". Es sencillo ampliar este abordaje a las fusiones de anticuerpos. El paso de moléculas de scFv por la ruta secretora de la levadura es eficaz, ya que se ha demostrado en levaduras el plegamiento, ensamblaje y la

secreción de Fab e IgG activos (Horwitz *et al.*, 1988;. Wood *et al.*, 1985).

Se clonó el gen AGA2 mediante PCR a partir de una genoteca de ADN_g de levadura y se subclonó en un vector de expresión que contenía el promotor fuerte de CUP 1 inducible por cobre que permite una variación 5 veces mayor del nivel de expresión. La secuencia codificante para el epítipo de identificación HA de la gripe (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) (SEC ID N° 1) se fusionó al extremo 3' del marco de lectura abierto AGA2, precedido por un sitio de escisión de proteasa específica de sitio del Factor Xa (Ile-Glu-Gly-Arg') (SEC ID N° 26). La secuencia de ADN de este constructo se muestra en la figura 7. Se han incluido sitios de restricción convenientes para la fusión "in-frame" de genes de anticuerpos monocatenarios.

Aunque la fusión Aga2p-HA es simplemente una construcción intermedia hacia la fusión final Aga2p-HA-anticuerpo, proporciona un medio para confirmar que un péptido de fusión está anclado y está accesible en la superficie celular de este sistema. El anclaje del péptido HA a la pared celular externa por la fusión se ha verificado mediante tinción de inmunofluorescencia de células enteras no fijadas con el AcMo 12CA5 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN), detectada mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (figura 9). Dado que las moléculas enteras de anticuerpo 12CA5 se unen al epítipo HA sin ningún tratamiento bioquímico perjudicial de la pared celular, la Aga2p es accesible al exterior de la célula para el reconocimiento macromolecular.

Como se ha descrito anteriormente, la subunidad de unión Aga2p se fija a la pared celular a través de enlaces disulfuro con Aga1p, que está anclada covalentemente a otros componentes de la pared celular. El tratamiento con DTT suprime el marcado con 12CA5, lo que indica que la fusión Aga2p-HA está fijada a la superficie celular mediante enlaces disulfuro. Se clonó el gen AGA1 mediante PCR y se subclonó cadena abajo del promotor GAL1. Se indujo la expresión de AGA1 cambiando a medios de cultivo con galactosa.

Se incluyó el epítipo de identificación HA en las fusiones de anticuerpos para permitir el doble marcado con fluorescencia para ambos niveles de anticuerpos de superficie y la unión de los antígenos marcados con fluorescencia. Este abordaje desacopla las variaciones célula a célula en el nivel de expresión de anticuerpos a partir de mediciones de una sola célula de la afinidad del antígeno. Por ejemplo, la inmunofluorescencia indirecta con IgG secundaria marcada con ficoeritrina contra el anticuerpo monoclonal a-HA proporciona una medida de los números de anticuerpo en superficie, mientras que el antígeno marcado con fluoresceína unido a anticuerpos proporciona una medida de la afinidad de unión. Debido a que se presentan $\approx 10^4$ copias de una a-aglutinina por célula, los efectos estocásticos sobre las mediciones de unión son mínimos. Dado que los citómetros de flujo comerciales pueden detectar menos de 10^3 moléculas de fluoróforo, la relación señal-ruido no debe resultar problemática. La relación entre fluorescencia verde (fluoresceína, es decir, la unión a antígeno) y fluorescencia roja (ficoeritrina, es decir, el número de anticuerpos) es proporcional a la fracción de anticuerpos unidos por el antígeno.

Con el fin de ensayar los factores de separación posibles con este método, se mezclaron en relaciones definidas células que expresaban el epítipo de identificación HA, con células de tipo silvestre. Se marcó la mezcla de células con IgG frente a a-HA marcada con fluoresceína y se clasificó la subpoblación con mayor fluorescencia mediante citometría de flujo. Se volvió a cultivar la fracción clasificada y se determinó la fracción de células que portaban la fusión Aga2p-HA mediante réplica en placa para un marcador genético asociado con el vector de expresión. A partir de esta información, se calculó la purificación en un solo pase posible mediante este método.

EJEMPLO 19

Fusión de un anticuerpo monocatenario anti-fluoresceína a una a-aglutinina

Se ha construido y caracterizado un anticuerpo monocatenario anti-fluoresceína basado en el anticuerpo monoclonal 4-4-20 (Bird, '88; Davis *et al.*, 1991.). Se sabe que este anticuerpo monocatenario se pliega de manera estable y conserva la afinidad de manera comparable a los fragmentos Fab. Se fusionó el gen para el anticuerpo monoclonal 4-4-20 al gen de fusión AGA2-HA existente para la expresión en la superficie de células de levadura.

Los anticuerpos monoclonales contra fluoresceína son un sistema modelo útil para los estudios físico-químicos de la interacción anticuerpo-hapteno. Mediante este sistema se han estudiado la cinética de la unión antígeno-anticuerpo (Kranz *et al.*, 1982), el análisis termodinámico de la formación de complejos (Herron *et al.*, 1986), el papel de las interacciones electrostáticas (Omelyanenko *et al.*, 1993) y la mutagénesis dirigida al sitio de un sitio de unión del anticuerpo (Denzin *et al.*, 1993).

La funcionalidad de la fusión de 4-4-20 presentada se determinó mediante la unión a dextrano marcado con fluoresceína múltiple (Sigma). Dado que la unión del anticuerpo extingue las emisiones de fluoresceína, la fluoresceína detectado representa los restos inmovilizados a dextrano que está unido a la levadura a través de la fluoresceína unida a 4-4-20.

EJEMPLO 20

Desarrollo del armazón de presentación

La levadura tiene dos receptores de superficie celular relacionados conocidos como α y α -aglutinina que actúan para intervenir en la adhesión célula-célula entre células haploides α y α como preludeo a la fusión para formar el diploide (Lu, 1995). Se ha demostrado que la α -aglutinina está unida covalentemente al glucano de la pared celular por el extremo C-terminal (Lu, 1995; Schreuder, 1993) y se cree que la α -aglutinina se ancla mediante un enlace similar (Lu, 1995). Se ha utilizado anteriormente la fusión a la porción C-terminal de una α -aglutinina para anclar las enzimas y los antígenos virales en la superficie de levaduras (Schreuder, 1993).

Como sistema modelo para el desarrollo del método de cribado de genotecas de presentación en la superficie de levaduras, los inventores han presentado un epítipo de identificación c-myc y scFv anti-fluoresceína funcional en la pared celular de levaduras mediante fusión a una α -aglutinina, que a diferencia de la α -aglutinina es una glicoproteína de dos subunidades (Fig. 2). La subunidad Aga1p de 725 residuos ancla el montaje a la pared celular (Roy, 1991) mediante enlace covalente β -glucano (Lu, 1995); la subunidad de unión de 69 aminoácidos Aga2p se une a Aga1p mediante dos enlaces disulfuro (Cappellaro, 1994). La actividad de unión de la α -aglutinina natural está localizada en el extremo C-terminal de Aga2p (Cappellaro, 1994); por lo tanto, esto representa un dominio molecular con accesibilidad a las macromoléculas extracelulares y un sitio útil para la inmovilización de proteínas para la presentación. Se construyó un vector para la presentación de proteínas como fusiones C-terminales a Aga2p (figura 3).

EJEMPLO 21

Verificación de la expresión y localización en superficie de scFv

La expresión de la fusión Aga2p-scFv es dirigida por el promotor inducible GAL1 (Johnston, 1984). El crecimiento de la levadura en medio con glucosa permite la represión esencialmente completa de la transcripción a partir del promotor GAL1, una consideración importante para evitar la contraselección contra secuencias que influyen negativamente en el crecimiento del hospedador. El cambio de las células a un medio que contiene galactosa induce la producción de los productos de los genes de fusión Aga1p y Aga2p, que se asocian con la ruta secretora y se exportan a la superficie celular. Se ha verificado la localización en superficie de la fusión Aga2p-scFv mediante microscopía de fluorescencia confocal y citometría de flujo. Se examinaron, mediante microscopía confocal de barrido láser, células marcadas de forma simultánea con un AcMo anti-c-myc y dextrano conjugado con fluoresceína (FITC-dextrano) (figura 8). Las células testigo que portaban un vector que dirige la presentación de un péptido irrelevante (es decir, un epítipo de identificación hemaglutinina (HA) solamente) no se marcan mediante el AcMo específico para el epítipo c-myc o FITC-dextrano (figura 8A).

Por el contrario, las células que portan el vector de presentación en superficie pCT202 que expresan la fusión Aga2p-scFv-c-myc se marcan conjuntamente mediante el anticuerpo anti-c-myc y FITC-dextrano (figura 8B), lo que demuestra que el sitio de unión a antígeno es accesible a macromoléculas muy grandes. Ambas cepas se tiñen positivamente mediante el AcMo 12CA5 dirigido contra el epítipo de identificación HA. La accesibilidad de la fusión para la unión a una IgG intacta (150 kDa) y a un polímero de dextrano de 2×10^6 Da indica una ausencia de impedimento estérico significativo de componentes de la pared celular, una ventaja significativa respecto a las proteínas presentadas en la superficie de *E. coli* que quedan internadas dentro de una capa de lipopolisacáridos que forma una barrera contra la difusión macromolecular.

El análisis de citometría de flujo de dos colores de estas cepas de levadura muestra asimismo el scFv presentado de manera accesible en la superficie celular. Se marcaron simultáneamente con el AcMo anti-c-myc 9E10 y FITC-dextrano cepas que presentaban el testigo negativo y el scFv. Los histogramas bivariantes demuestran una relación lineal entre la intensidad de la fluorescencia de ficoeritrina (nivel de unión del AcMo 9E10) y fluorescencia FITC (unión del antígeno) para la población de células que portan el plásmido de presentación de 4-4-20, mientras que la población testigo presenta fluorescencia de fondo (figuras 9A y B). La distribución de la intensidad de fluorescencia dentro de la fracción positiva ilustra la importancia de corregir la señal de unión a antígeno para la variabilidad célula a célula en el número de fusiones presentadas, tal como se determina mediante marcado del epítipo de identificación.

La cuantificación de la eficacia de presentación por comparación de una población de células que presentan scFv con los patrones de calibración de capacidades de unión de anticuerpos conocidos proporciona un valor medio superior a 3×10^4 fusiones por célula. El tratamiento de las células que presentan la fusión Aga2p-scFv con ditiotreitól antes del marcado eliminaba la tinción de la superficie de la célula por el FITC-dextrano y el AcMo 9E10 (figura 9C), coherente con la adhesión de la proteína de fusión a la superficie celular mediante una interacción específica de enlaces disulfuro entre Aga1p y la subunidad Aga2p recombinante. Esta propiedad ilustra otra característica importante del sistema de presentación en levaduras, a saber, que las proteínas pueden ser simplemente liberadas de la superficie celular por reducción para una caracterización posterior.

Para examinar adicionalmente la especificidad de la interacción 4-4-20/fluoresceína, se llevó a cabo un ensayo de disociación competitiva utilizando un análogo no fluorescente de la fluoresceína, la 5-aminofluoresceína. El análisis de estos datos proporciona una constante de velocidad de disociación monovalente (K_{off}) a 21°C de $3,7 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ para el FITC-dextrano y de $3,9 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ para la fluoresceína-biotina. La extrapolación del ajuste

exponencial a $t = 0$ segundos muestra que la valencia media de la interacción de una molécula de FITC-dextrano con scFv es inferior a 1,5. Se obtuvieron resultados similares utilizando como competidor inulina fluoresceinada, albúmina de suero bovino conjugada con fluoresceína y biotina-fluoresceína, lo que indica que el marcado de las células mediante FITC-dextrano o fluoresceína-biotina se debe a una interacción específica entre la fusión presentada y el resto de fluoresceína. Además, la cinética de disociación de la sal disódica de fluoresceína (FDS) del 4-4-20 scFv presentado en superficie coincidía con los del 4-4-20 scFv soluble producido por la levadura como se observa mediante espectrofluorometría.

EJEMPLO 22

Enriquecimiento de las células de presentación mediante clasificación de células por citometría de flujo

Para determinar la eficacia de la clasificación mediante citometría de flujo con la presentación en la superficie de levaduras, se clasificaron mezclas de levadura que portaban el vector de presentación en superficie con aquellas que carecían del marcador seleccionable asociado y se determinaron independientemente las puridades mediante réplica en placas. Se obtienen factores de enriquecimiento significativos (hasta 600 veces) (TABLA I). Por lo tanto, pueden seleccionarse los clones raros a partir de genotecas de presentación en levaduras enriqueciendo inicialmente las células positivas en condiciones de rigurosidad moderada y alto rendimiento para proporcionar una población más pequeña que a continuación puede someterse a varios pases de clasificación más rigurosa para aislar los clones raros.

TABLA I

Las células que presentan 4-4-20 pueden enriquecerse selectivamente mediante citometría de flujo

Fracción inicial w/ pCT202	Réplica Colonias	Fracción clasificada w/ pCT202	Enriquecimiento Factor
14%	48/58	83%	6x
0,5%	87/92	95%	200x
!! - 0,1%*	34/58	59%	600x

* La fracción inicial se calculó mediante citometría de flujo.

EJEMPLO 23

Aislamiento de scFv mutante con menor k_{off} a partir de una genoteca mutagenizada de presentación en levaduras

Se ha descrito la selección de genes scFv mutagenizados al azar mediante propagación en una cepa "mutágena" de *E. coli* (Low, 1996). Se expresó en levadura una genoteca de $\sim 5 \times 10^5$ mutantes 4-4-20 scFv creada mediante propagación del vector de presentación en superficie de levadura en una cepa de este tipo. La combinación de células que presentaban la genoteca de scFv se sometieron a selección cinética mediante competencia de células marcadas con FITC-dextrano con 5-aminofluoresceína. Se recogieron las células positivas para c-myc que presentaban la relación más elevada entre fluorescencia FITC y PE mediante clasificación por citometría de flujo (figura 10A), se amplificaron volviendo a cultivar en condiciones de represión de la fusión (fuente de carbono de glucosa), se indujeron mediante presentación de fusión en superficie y se volvieron a clasificar. Las células que demostraron un aumento sustancial del tiempo de persistencia del marcado mediante FITC-dextrano se enriquecieron de manera espectacular después de tres rondas de clasificación y amplificación (figura 10).

La cinética de disociación del FITC-dextrano para dos clones individuales seleccionados de entre la genoteca de scFv diferían en 2,9 veces en comparación con los 4-4-20 scFv de tipo silvestre (figura 11). Las constantes de velocidad para los mutantes fueron $1,9 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ (mutante 4M1.1) y $2,0 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ (4M1.2) a 23°C , en comparación con $5,6 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ para el de tipo silvestre; experimentos similares arrojaron valores k_{off} para la fluoresceína-biotina de $2,4 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$, $2,8 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ y $5,0 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$, respectivamente. Además, la cinética de disociación de la fluoresceína soluble determinada mediante espectrofluorometría demostró una mejora de 2,2 veces para ambos mutantes con respecto a la de tipo silvestre y los experimentos iniciales de extinción de la fluorescencia en equilibrio sugieren una mejora similar en la constante de afinidad de la reacción de unión. El aislamiento de clones con una reducción de la velocidad de disociación de sólo tres veces demuestra la capacidad de este método de cribado para conseguir distinciones cuantitativas precisas.

De 26 clones seleccionados analizados individualmente, dos habían mejorado de forma idéntica la K_{off} (4M1.1 y 4M1.2, descritos anteriormente); dos demostraron una K_{off} de tipo silvestre con una disminución del marcado c-myc que sesgaba la relación lineal nivel de expresión/actividad; uno presentaba marcado c-myc y K_{off} de tipo silvestre; 21 se unieron con una K_{off} aparente aproximadamente 10 veces menor que la de tipo silvestre sólo al FITC-dextrano 2×10^6 Da polivalente, pero no a la fluoresceína-biotina o al FITC-dextrano monovalente. El uso de un antígeno polivalente (aproximadamente 90 fluoresceínas por dextrano) dio como resultado el enriquecimiento para los clones con una avidéz aumentada; los efectos de la avidéz pueden evitarse de manera eficaz mediante un diseño apropiado de las condiciones de cribado para asegurar la unión del antígeno monovalente. Además, la selección de

los mutantes de epítipo de identificación pueden eliminarse detectando alternativamente el nivel de expresión mediante marcado con el marcador c-myc y HA en rondas de clasificación secuencial o mediante estrategias alternativas de mutagénesis dirigidas a cambios sólo para el gen de scFv.

5 Estos resultados muestran que los fragmentos scFv pueden presentarse en la superficie de levaduras de manera accesible para el reconocimiento macromolecular y pueden abordarse mediante construcción de genoteca combinatoria y cribado. El scFv presentado se une específicamente al antígeno -- la primera demostración de un
10 fragmento de anticuerpo funcional presentado en la superficie de la célula de levadura. La aplicación de este sistema de presentación a los métodos de genoteca para la maduración de la afinidad de anticuerpos *in vitro* y para la
15 presentación de otras proteínas de mamífero es una alternativa complementaria significativa a las tecnologías existentes, tales como la presentación en bacteriófagos, la presentación en la superficie bacteriana y el método de doble híbrido en levadura. De hecho, el éxito de la primera tentativa literal del sistema de presentación en levadura en la recuperación de mutantes scFv de unión a fluoresceína mejorada a partir de una genoteca relativamente
pequeña en condiciones de cribado no optimizadas demuestra claramente la solidez de esta tecnología. El análisis
cinético altamente cuantitativo demostrado de scFv inmovilizado a la superficie y la excelente discriminación de
clones con características de unión similares da fe además del gran potencial de la presentación en levaduras para
la optimización combinatoria de proteínas.

EJEMPLO 24

20 Presentación de un anticuerpo al receptor de linfocitos T en el sistema de presentación en levaduras

En el presente documento, se expresó un scFv (KJ16) específico para la región Vb8 del receptor de linfocitos T (Roehm *et al.*, 1985) en el sistema de presentación en levaduras. Este scFv-KJ16 inhibía la actividad de los linfocitos
25 T bloqueando de forma competitiva el reconocimiento de un ligando de TCR tal como el superantígeno enterotoxina estafilocócica B (Cho *et al.*, 1995). Puesto que las variantes de afinidad de este scFv pueden mostrar inhibición mejorada de los linfocitos T, se examinó el uso del sistema de presentación en levaduras en el diseño de formas de mayor afinidad de scFv-KJ16.

30 Se desarrolló un cribado en base a la unión en equilibrio del scFv de superficie celular al antígeno marcado con fluorescencia, un TCR monocatenario de Vb8 (Schlueter *et al.*, 1996). Mediante la clasificación de flujo de doble canal, la selección también se basó en la unión de un anticuerpo anti-c-myc marcado con fluorescencia a un
35 marcador c-myc de diez residuos en el extremo carboxilo terminal del scFv. Se aislaron las variantes de scFv con mayor afinidad por el TCR o con menor afinidad por el anticuerpo anti-c-myc. Como era de esperar, las primeras tenían una mutación en un CDR (CDR1 de V_L) y las segundas tenía una mutación en el epítipo c-myc. Por lo tanto, estos hallazgos demuestran que el abordaje de presentación en levaduras puede utilizarse ya sea para aislar scFv de mayor afinidad o para identificar los epítipos de una proteína presentada reconocida por un AcMo concreto.

Plásmidos y cepas

40 Se subclonaron, mediante PCR, los genes de V_L y V_H de scFv-KJ16 unidos por un conector 205 modificado (Cho *et al.*, 1995), en el vector pCR-Script (Stratagene, La Jolla, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se incluyó un epítipo de identificación c-myc en el extremo carboxilo terminal del scFv. Se escindió de PCR-Script el fragmento
45 *NheI/XhoI* de ~ 800 pb que contenía el scFv y se ligó en el vector de presentación en superficie de levadura pCT202 que contenía un epítipo de identificación de nueve residuos (HA) y el marco de lectura abierto AGA2 cadena abajo del promotor inducible GAL1. El constructo resultante se transformó mediante el método de transformación con acetato de litio (LiAc) de Gietz y Schiestl (Gietz *et al.*, 1995) en la cepa de *S. cerevisiae* BJ5465 (a ura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4::His2 prbD1.6 can1 GAL; Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA) que contenía un AGA1 cromosómicamente integrado controlado por el promotor GAL1 (cepa EBY100).

EJEMPLO 25

Inducción y detección del scFv-KJ16 en la superficie de levaduras

55 Las células de levadura transformadas con pCT202/scFv-KJ16 se cultivaron durante toda la noche a 30°C con agitación en 3 ml de medio selectivo con glucosa SD-CAA (glucosa al 2% en peso, base nitrogenada de levadura de Difco al 0,67% en peso, casaminoácidos al 0,5% en peso). Después de ~ 18-20 horas, se indujo la expresión recombinante de AGA1 + AGA2-scFv a 20°C con agitación en 5 ml de medio selectivo con galactosa (SG-CAA, en el que la glucosa en el SD-CAA es sustituida por galactosa al 2%). Los cultivos se recogieron después de ~ 20-24
60 horas (1-2 duplicaciones) mediante centrifugación, se lavaron con PBS (NaPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3) que contenía albúmina de suero bovino al 0,1% y azida al 0,05% y se incubaron 45 minutos en hielo con 25 ml de 10 mg/ml de AcMo 12CA5 anti-HA (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN), AcMo 9E10 anti-c-myc (dilución 1:100 de líquido ascítico sin procesar; Berkeley Antibody Co., Richmond, CA) o scTCR biotinilado [~ 360 nM] preparado a partir de cuerpos de inclusión expresados en *E. coli* (Schodin *et al.*, 1996). Las células se lavaron con PBS y se
65 incubaron 30 minutos en hielo con IgG de cabra anti-F(ab')₂ de ratón marcado con FITC (1:50; Kirkegaard and Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD) o un conjugado ficoeritrina-estreptavidina (SA-PE) (1:100; PharMingen, San Diego,

CA). Las células de levadura marcadas se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics XL en el Flow Cytometry Center del Centro de Biotecnología de la UIUC. La tasa de acontecimientos fue de ~ 250 células/segundo. Se recogieron los datos de 10.000 acontecimientos y se sometió a selección la población según la dispersión de luz (tamaño) para evitar el análisis de los agregados celulares. Estas condiciones también se utilizaron para generar isothermas de unión a antígeno en equilibrio después de la incubación de la levadura scFv-KJ16 con diversas diluciones de scTCR. Se realizó un análisis de Scatchard para determinar los valores de K_D , utilizando la concentración calculada del scTCR biotinilado y la media de unidades de fluorescencia tomada directamente de los datos de flujo.

10 **EJEMPLO 26**

Producción de una genoteca aleatoria de mutantes scFv-KJ16

15 Se transformaron aproximadamente 50 ng de pCT202/scFv-KJ16 en células de *E. coli* XL1-Red (Stratagene, La Jolla, CA) según el protocolo del fabricante. Después de 1 hora de inducción en medio SOC, la recuperación se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en 500 ml de medio LB líquido que contenía 100 mg/ml de ampicilina más 50 mg/ml de carbenicilina (LB-AMP100-CARB50). Se añadió la resuspensión a 15 ml de LB-AMP100-CARB50 en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se cultivó a 37°C con agitación. Se regeneró el cultivo con 15 ml de LB-AMP100-CARB50 de nueva aportación en fase semilogarítmica ($DO_{600} \sim 0,2-0,4$) y a continuación se hizo crecer hasta la saturación ($DO_{600} \sim 1,0-1,1$; esto se consideró un "ciclo" o ronda de mutación). Se añadió una pequeña fracción de este cultivo (0,75 ml) al siguiente ciclo (15 ml de LB-AMP100-CARB50). Después de seis ciclos de crecimiento, se realizaron preparaciones de plásmido de ADN Wizard Miniprep (Promega, Madison, WI) en el cultivo de 15 ml. Se transformaron aproximadamente 4,5 mg de ADN de pCT202/scFv-KJ16 del sexto ciclo en cada uno de 3 tubos de la cepa de levadura EBY100 utilizando el método LiAc (Gietz *et al.*, 1995). Se combinaron las 3 reacciones y después de la resuspensión en 1 ml de ddH₂O, se sembró 1/2.000 de la combinación en placas selectivas para determinar la eficacia de transformación. Se inocularon cincuenta mililitros de SD-CAA con el resto del cultivo, se cultivaron durante toda la noche a 30°C con agitación, se sometieron a pases hasta una $DO_{600} = 0,05$ y se cultivaron durante toda la noche a 30°C hasta una $DO_{600} > 1,0$. A continuación, se inocularon cinco mililitros de SG-CAA hasta una $DO_{600} \sim 0,5$ y se cultivaron durante toda la noche a 30°C con agitación hasta una $DO_{600} = 1,0-2,0$.

30 **EJEMPLO 27**

Selección de genoteca de mutantes scFv-KJ16 mediante FACS

35 Las células se marcaron doblemente como se ha descrito anteriormente con AcMo anti-c-myc y scTCR biotinilado (utilizado a una concentración de ~ 10 nM). Se ajustó el volumen de reacción para mantener un exceso molar de ~ 10 veces de antígeno (scTCR) en la superficie de scFv. Las muestras se clasificaron en un banco de trabajo Coulter 753 con una ventana de clasificación como se muestra en la figura 3 y una tasa de acontecimientos de 4.000 células/segundo. Se examinaron un total de 8×10^7 células durante la primera ronda de clasificación, recogiendo un 0,1%-0,4% de la población. Las células recogidas se volvieron a cultivar a 30°C en SD-CAA y se cambiaron a SG-CAA antes de la siguiente ronda de clasificación. Se realizó un total de 4 rondas de clasificación, las 2 primeras clasificaciones en modo de enriquecimiento (elevada recuperación de todos los clones positivos) y las 2 últimas clasificaciones en modo de purificación (células negativas coincidentes rechazadas). Inmediatamente después de la última clasificación, las células recogidas se volvieron a clasificar y se sembraron en placas selectivas para aislar clones individuales.

45 **EJEMPLO 28**

Rescate y secuenciación de genes scFv-KJ16 mutantes

50 Se rescataron los plásmidos de levadura scFv-KJ16 (wt y 2 mutantes) según el protocolo descrito por Ward (Ward, 1991), salvo que las células se rompieron con un homogenizador tipo "bead beater" (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK) durante 2 minutos en lugar de agitación en vórtex. Se centrifugaron las células durante 1 minuto y se recogió la fase superior (acuosa). Se utilizó un kit de minipreparación Wizard[®] (Promega, Madison, WI) para preparar el plásmido de ADN y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) con 1 ml de la preparación de ADN utilizando el método de CaCl₂. Se sembraron las transformaciones en LB-AMP50. Se llevó a cabo la secuenciación de wt scFv-KJ16 y dos mutantes (mut4 y mut7) utilizando cebadores que flanqueaban el scFv del vector de presentación y secuenciación de fluorescencia automatizada (Genetic Engineering Facility del Centro de Biotecnología de la UIUC).

60 **EJEMPLO 29**

Unión de TCR por scFv en superficie celular de levaduras

65 El anticuerpo monoclonal anti-TCR KJ16 reconoce un epítipo conformacional en la cadena Vb8 del TCR

(Brodnicki *et al.*, 1996). Se ha utilizado KJ16 para muchos estudios *in vivo* en ratones, incluidas las tentativas para dirigirse a y eliminar la población Vb8 de los linfocitos T (Born *et al.*, 1987, McDuffie *et al.*, 1986, Roehm *et al.*, 1985). Para evaluar los posibles efectos de la distinta afinidad de los anticuerpos en la mediación de estos efectos, se examinó el uso de un sistema de presentación en levaduras para identificar las variantes de KJ16 con una mayor afinidad por el TCR. Se ha clonado anteriormente el gen de scFv a partir del anticuerpo anti-TCR KJ16 y la proteína scFv presentaba aproximadamente la misma afinidad, $K_D \sim 120$ nM que los fragmentos Fab de KJ16 (Cho *et al.*, 1995).

Se subclonó la secuencia codificante de scFv-KJ16 de manera que se expresase como un polipéptido de fusión, expresándose la subunidad aglutinina Aga2p en la superficie de células de levadura. El polipéptido de fusión incluye un epítipo de identificación hemaglutinina (HA) N terminal con respecto al scFv y un epítipo de identificación c-myc en el extremo carboxilo terminal. La inclusión de estos epítipos permite utilizar en la citometría de flujo anticuerpos monoclonales anti-HA (12CA5) y anti-c-myc (9E10) para cuantificar la expresión en superficie del scFv de longitud completa independientemente de la actividad de unión a antígeno. Tal normalización ayuda a explicar los efectos de la variabilidad de célula a célula en los niveles superficiales del polipéptido de fusión. Como se analiza más adelante, la disponibilidad de dos epítipos de identificación independientes también puede controlar la selección de mutantes de epítipo individuales que podrían no resultar deseables en el cribado de mutantes de unión a ligando. Para evaluar las propiedades de unión del scFv de superficie celular, se biotiniló un TCR Vb8-Va3 monocatenario soluble (Schodin *et al.*, 1996) y se detectó el ligando unido con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina.

La figura 12 muestra que la levadura transformada con el plásmido scFv-KJ16/Aga2 expresaba el epítipo HA (figura 12A) y el epítipo c-myc (figura 12B). Las levaduras testigo transfectadas sólo con el vector de expresión Aga2p/HA fueron positivas para el AcMo anti-HA pero no para el anticuerpo anti-c-myc. Se ha descubierto que la fracción de células en la población no fluorescente depende de la estabilidad del plásmido y de la fase de crecimiento del cultivo, pero se desconocen los procesos fisiológicos que están implicados. Sin embargo, la disminución de la temperatura de inducción a 20°C y la disminución del tiempo de inducción a menos de dos duplicaciones de cultivo produce poblaciones con > 75% de las células presentando el scFv-KJ16. El scFv-4-4-20 se presentaba con este sistema con aproximadamente la misma proporción de células positivas.

La unión del scTCR biotinilado al scFv de superficie celular también se detectó mediante citometría de flujo (figura 12C). La fracción de células que expresaban scFv activo fue similar a la detectada con anticuerpos anti-HA y c-myc, coherente con la expresión del scFv de longitud completa correctamente plegado. Además, los histogramas de dos colores demostraron una estrecha correlación de la unión de scTCR con la presentación del epítipo HA y del c-myc. La unión del ScTCR biotinilado es específica para la levadura que presenta el scFv-KJ16 y era completamente inhibida por el exceso de IgG KJ16 soluble (figura 12D).

La afinidad aproximada del scFv-KJ16 presentado en superficie se determinó *in situ* sobre la pared celular mediante titulación de células enteras con distintas concentraciones de scTCR biotinilado. Se midió la unión en equilibrio analizando el scTCR unido a las células mediante citometría de flujo. El análisis de Scatchard de los datos de unión (figura 13) produjo una K_D de 500 nM, dentro de una quinta parte de la observada para el scFv-KJ16 soluble. Tal concordancia resulta razonable, ya que la K_D se calculó bajo el supuesto de que el 100% del scTCR era activo, lo que probablemente sea una sobrevaloración (es decir, si sólo el 20% estuviese correctamente plegado, entonces el scFv de superficie tendría una $K_D \sim 100$ nM). Anteriormente se descubrió que una fracción sustancial del scTCR purificado a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* solubilizados estaba incorrectamente plegada (Schodin *et al.*, 1996).

EJEMPLO 30

Selección de scFv-KJ16/levadura mutagenizado mediante clasificación de células activadas por fluorescencia

Se ha utilizado una cepa mutágena de *E. coli* para mutagenizar un scFv para determinar la maduración de la afinidad mediante presentación en bacteriófagos (Low *et al.*, 1996). Este abordaje tuvo éxito en la identificación de un mutante de scFv-4-4-20 con mayor afinidad para la fluoresceína utilizando la presentación en levaduras. Una fortaleza de este abordaje de mutagénesis es su simplicidad, que sólo necesita la transformación de *E. coli* y el crecimiento celular. Además, la cepa mutágena de *E. coli* introduce mutaciones en todo el plásmido de expresión y por lo tanto, no induce a cambios a las porciones del scFv que se cree es importante para determinar las características de unión. Que este aspecto de la mutagénesis de la cepa mutágena sea ventajoso dependerá de la capacidad para identificar los residuos clave que podrían influir en la unión al antígeno, en base a la información estructural disponible. El examen de los estudios de maduración de la afinidad publicados sugieren que no puede predecirse *a priori* la localización de tales residuos, generalmente en residuos sin contacto (Hawkins *et al.*, 1993, Patten *et al.*, 1996, Schier *et al.*, 1996, Thompson *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1995, Yelton *et al.*, 1995).

Para aplicar esta estrategia al scFv-KJ16, se propagó el plásmido scFv-KJ16/Aga2 en la cepa mutágena de *E. coli* XL1-Red (Stratagene) durante seis ciclos de crecimiento. Se predijo que este procedimiento introduciría un promedio de dos a tres mutaciones puntuales en la secuencia codificante de scFv, en base a una frecuencia de

mutación por ciclo de 1 en 2.000 pb. La preparación de plásmido resultante se transformó en levadura, produciendo un tamaño de genoteca de aproximadamente 3×10^5 transformantes. En otros trabajos se han obtenido genotecas más grandes (10^7) mediante optimización adicional de los procedimientos de transformación y combinando transformaciones independientes. Este número no representa un límite superior de tamaño para la construcción de genotecas, ya que podrían aplicarse sencillamente tentativas adicionales para la optimización y el aumento de escala.

Se sometió la genoteca de levadura mutagenizada a cuatro ciclos sucesivos de cribado y amplificación, utilizando una doble tinción para la unión al anticuerpo anti-c-myc (FITC) y la unión al scTCR biotinilado (PE). Se utilizó TCR biotinilado a una dilución 1:5.000 (~ 10 nM) que produjo justo por debajo del umbral detectable de unión por wt scFv-KJ16/levadura (figura 13). Se muestran los dos perfiles de fluorescencia en canal de la muestra de scFv-KJ16 mutado después de un ciclo de clasificación (figura 14A) y después de cuatro ciclos de clasificación (figura 14B). Las células que presentaron fluorescencia por encima de la ventana diagonal mostrada en la figura 14 se recogieron para volver a cultivarse. Las razones que justificaban esta ventana diagonal era que en una determinada ronda los criterios de clasificación se basaban en la unión a antígeno por fusión de polipéptido presentada. Por ejemplo, la selección basada solamente en los niveles de fluorescencia PE superiores (es decir, la unión de scTCR) incluiría no sólo los mutantes con scFv de mayor afinidad, sino los que presentaban una mayor densidad de scFv por célula de levadura. Los últimos mutantes se eliminarían en principio incluyendo el anticuerpo anti-c-myc como uno de los dos parámetros para la normalización a la variabilidad de la expresión en superficie. Las dos primeras rondas de clasificación se realizaron en modo de enriquecimiento, aislando el $\sim 0,5\%$ de la población de células con la fluorescencia más elevada y no ajustando el software de clasificación para que rechazase las coincidencias (dos células en la misma gotita clasificada). Las últimas dos rondas de clasificación se realizaron para determinar la pureza, con alto rechazo de coincidencias. Después del cuarto ciclo, se clasificaron y sembraron inmediatamente las células. Se seleccionaron diez colonias (mut1-10) para su posterior análisis.

EJEMPLO 31

Caracterización del scFv-levadura mutante

Se marcó cada uno de los 10 mutantes seleccionados con anticuerpo anti-HA, anticuerpo anti-c-myc y TCR biotinilado y se analizaron mediante citometría de flujo (figura 15). Como era de esperar, un clon (mut6) resultó fentípicamente similar a wt scFv-KJ16/levadura. Se descubrió que otro clon (mut7) presentaba niveles más elevados de unión a TCR, un resultado confirmado mediante varias titulaciones independientes. Finalmente, varios de los mutantes (mut 1-5, 8, 9) presentaron sistemáticamente una unión reducida al anticuerpo anti-c-myc en comparación con la unión del anticuerpo anti-HA o el scTCR biotinilado. La presencia de esta clase de mutantes podría explicarse por la especificación de la ventana de clasificación diagonal: como se muestra en la figura 14, las células pueden "desplazarse" a la ventana de clasificación, ya sea aumentando la unión de scTCR (PE) a una señal de c-myc (FITC) constante o, como alternativa, disminuyendo la unión a c-myc (FITC) a una señal de scTCR (PE) constante. La selección de estos mutantes podría evitarse fácilmente utilizando ambos epítomos de identificación en la fusión, HA y c-myc. Por lo tanto, alternando el marcado de cada uno de estos epítomos de identificación en cada ronda de clasificación, no se enriquecería la unión disminuida a uno de los epítomos de identificación en las rondas de clasificación consecutivas como en este caso.

Se compararon los histogramas de fluorescencia del presunto mutante del epítopo c-myc (mut4), el mutante de unión a scTCR (mut7) y otro mutante (mut10) con el wt scFv (figura 16). Mut4 (figuras 16A y 16B) presentó una reducción del marcado anti-c-myc, mut7 presentó una unión a scTCR mejorada (figuras 16C y 16D) y mut10 no presentó un cambio en ninguno de los dos, pero la fracción de células que fueron positivas fue mayor que con el wt scFv (figuras 16E y 16F). Como se muestra en las figuras 16E y 16F, cerca del 100% de las células mut10 fueron positivas para cada uno de los agentes ensayados. Esto está en contraposición con cada uno de los demás mutantes (por ejemplo, véase mut4 y mut7) que se parecían a wt scFv-KJ16 levadura por presentar dos poblaciones distintas de células, una con niveles reducidos de scFv de superficie celular. La estabilidad plasmídica mejorada de mut10 y los repetidos fracasos para rescatar el plásmido de expresión a partir de mut10 en *E. coli* sugieren que se ha producido la integración cromosómica con este plásmido mutante. Por lo tanto, las características de expresión en superficie modificadas de mut10 parecen ser una consecuencia de la integración del plásmido de expresión.

Se calculó la afinidad de unión a scTCR para los mutantes mostrados en la figura 16 mediante titulación con scTCR biotinilado soluble (figura 17). La curva de ajuste no lineal de estos datos indican una K_D no modificada para mut4 y mut10, pero un triple aumento de la afinidad para mut7. El aumento de la fluorescencia media de mut10 se debe a la ausencia de una cola no fluorescente en la distribución más que al aumento de unión a scTCR, como resulta evidente en las figuras 16E y 16F.

EJEMPLO 32

Secuencias del scFv mutante

Se determinaron las secuencias de nucleótidos del wt-scFv-KJ16 clonado en el plásmido de presentación en

levaduras, y mut4 y mut7 después del rescate de los plásmidos a partir de levaduras (figura 18). El wt scFv-KJ16 contenía dos cambios silenciosos de la secuencia de scFv publicada originalmente (Cho *et al.*, 1995). Estos pueden haber sido introducidos por la PCR antes de la clonación del scFv en el plásmido de presentación en levaduras. La secuencia de mut4 contenía una mutación y mut7 contenía dos mutaciones. La única mutación en mut4 estaba presente en el epítipo c-myc (Lys a Glu), coherente con su unión reducida por el anticuerpo anti-cmyc como se ha descrito anteriormente. Mut7 contenía un cambio de Arg a Lys en una región estructural de la región V_L y un cambio de Ser a Arg en la CDR1 de la cadena V_L. La última mutación es coherente con la mayor afinidad de unión observada para mut7.

Se ha utilizado la presentación en bacteriófagos para la selección del scFv con mayor afinidad de unión a antígeno, así como el aislamiento de nuevos scFv a partir de genotecas no inmunes (Hoogenboom, 1997). Sin embargo, han existido dificultades en la expresión de algunas proteínas de mamíferos en *E. coli*, en parte debido a la toxicidad, la preferencia codónica o los problemas de plegamiento (por ejemplo, Knappik y Pluckthun, 1995, Ulrich *et al.*, 1995, Walker y Gilbert, 1994). La expresión en levaduras puede evitar potencialmente algunos de estos problemas, ofreciendo la ventaja de que las proteínas pueden expresarse con modificaciones post-traduccionales eucariotas (por ejemplo, glicosilación e isomerización de enlaces disulfuro eficaz). Además, la presentación en bacteriófagos no tiene generalmente la precisión cuantitativa para discriminar entre mutantes con una afinidad de unión que difiera en menos de cinco veces (Kretzschmar *et al.*, 1995). Por el contrario, el marcado con fluorescencia y la clasificación permitían el aislamiento de clones 4-4-20 scFv con una afinidad sólo 3 veces mayor. Como la mayoría de los grandes cambios en la afinidad de unión a antígeno son el resultado de la combinación dirigida de mutaciones puntuales, cada una con menores efectos (Hawkins *et al.*, 1993, Schier *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1995), la capacidad para identificar mejoras sutiles en la afinidad podría tener un valor significativo. Con estas ventajas en mente, se ha desarrollado el uso de un sistema de presentación en levaduras para la maduración de la afinidad de un scFv anti-receptor de células T.

Se utilizó un scFv que es específico para la región Vb8 de un TCR de ratón con el fin de generar reactivos anti-TCR que, en última instancia, puedan tener propiedades mejoradas de dirección a los linfocitos T *in vivo* (Cho *et al.*, 1997, Cho *et al.*, 1995). Se expresó el scFv activo como una proteína de fusión Aga2p en la superficie de levaduras, con una afinidad que fue similar a la del scFv natural (~ 500 nM en comparación con los 120 nM para el scFv). Para seleccionar el scFv de mayor afinidad, la mutagénesis aleatoria con una cepa de *E. coli* deficiente para la reparación del ADN produjo una frecuencia de mutación de ~ 2 a 3 por cada 1.000 pares de bases después de seis ciclos de crecimiento. Se utilizó la citometría de flujo con scTCR marcado con fluorescencia y anticuerpos anti-c-myc para la clasificación de células que presentaban los scFv con afinidad por scTCR aumentada. Se incluyó el anticuerpo anti-c-myc como segundo criterio de selección para controlar los mutantes con unión a TCR aumentada debido no a la mayor afinidad, sino debido a una mayor expresión en la superficie celular de la fusión scFv-c-myc. Después de múltiples rondas de selección, se observaron tres clases fenotípicas mutantes: 1) unión reducida al anticuerpo c-myc pero unión a scTCR no modificada (mut1-5 8, 9); 2) unión mejorada al scTCR con marcado c-myc no modificado (mut7); y 3) mayor eficacia de la expresión en superficie debido a la integración cromosómica del vector (mut10).

Pudo predecirse el aislamiento de las clases de mutantes que están representados por mut4 y mut7 a partir de los criterios de selección que se ilustran en la figura 14. Es decir, cualquier célula mutante que se identificó por encima del límite de la ventana diagonal de clasificación podría explicarse mediante cualquiera de las propiedades descritas para mut4 y mut7, ya que un aumento de la señal de scTCR (PE) o una disminución de la señal de c-myc (FITC) coloca una célula en la ventana de clasificación. Sin embargo, esto no representa un problema sustancial para este abordaje, debido a la disponibilidad de dos epítipos de identificación independientes. Mediante la utilización de marcadores HA y c-myc en ciclos de clasificación alternos, no debería producirse un enriquecimiento progresivo del marcado disminuido de uno de los epítipos de identificación.

El aislamiento de mutantes de epítipo de identificación destaca una aplicación adicional para la presentación en la superficie de levaduras: el mapeo de epítipos reconocidos por anticuerpos monoclonales. Aunque las estrategias alternativas que utilizan genotecas de péptidos han tenido éxito en este sentido para los epítipos lineales, el abordaje descrito en el presente documento puede ampliarse a epítipos conformacionales. Por consiguiente, puede presentarse una proteína correctamente plegada en la superficie de células de levadura y puede aplicarse la mutagénesis aleatoria sencilla como se describe en el presente documento para identificar los residuos de epítipo de la secuencia polipeptídica no contigua. Dado que el aparato de control de calidad de la secreción eucariota retiene y degrada las proteínas no plegadas y se identifican diversos niveles de expresión mediante el marcado HA o c-myc, debería reducirse al mínimo la falsa identificación de residuos de epítipo mediante este procedimiento. El abordaje descrito es bastante más fácil que la mutagénesis mediante alanina.

No está claro por qué mut10 estaba enriquecido en este cribado, ya que su marcado de receptor de linfocitos T monocatenario medio por marcado c-myc no estaba modificado. Es posible que la mayor fracción de células marcadas positivamente influyese en este clon para el enriquecimiento debido al excedente aleatorio en la ventana de clasificación. En cualquier caso, el marcado scTCR y c-myc no fueron diferentes para este clon y los reordenamientos estructurales del plásmido de expresión indican que se había integrado en un cromosoma.

La identificación de una sola mutación CDR única en mut7 es coherente con el hallazgo de que este scFv mutante tiene una unión mejorada al receptor de linfocitos T. Las futuras tentativas para obtener sólo scFv con mayor afinidad para el receptor de linfocitos T (y no mutantes de c-myc) implica la selección alterna con anticuerpos anti-HA y anti-c-myc para controlar los niveles en la superficie celular del scFv. Esta estrategia, combinada con técnicas de barajado de ADN entre los mutantes seleccionados (Stemmer, 1994), debería permitir el aislamiento de scFv-KJ16 con una afinidad considerablemente mayor que el wt scFv ($K_D \sim 120$ nM). Tales scFv KJ16 mutantes pueden utilizarse para ensayar los fenómenos cinéticos de señalización de linfocitos T, así como la dirección de la citólisis dependiente de linfocitos T a través de anticuerpos biespecíficos (Cho *et al.*, 1997).

La presente descripción demuestra el aislamiento intencional de anticuerpos con afinidad madurada a través de la presentación en la superficie celular. Como se ha descrito anteriormente, se empleó la selección de la velocidad de disociación para identificar mutantes con velocidades de disociación reducidas, mientras que en la expresión de scFv-KJ16, se utilizó la unión a antígeno equilibrada. Estos dos abordajes son complementarios y dependen de la afinidad del scFv de partida. Para $K_D > 1$ nM, resulta razonable aplicar la estrategia del equilibrado con antígeno marcado soluble ya que las velocidades de disociación serían demasiado rápidas para permitir una discriminación eficaz de la variación cinética. Además, a estas afinidades inferiores antígeno soluble en bruto no se agota sustancialmente de la mezcla de reacción de marcado, dado que el scFv presentado está presente a concentraciones efectivas de aproximadamente 1 nM-10 nM. Por el contrario, los anticuerpos firmemente unidos, tales como 4-4-20 ($K_D = 0,4$ nM) agotarían los antígenos marcados solubles hasta concentraciones por debajo de K_D a menos que se emplearan de modo poco práctico grandes volúmenes de marcado. Sin embargo, la cinética de disociación para tales anticuerpos firmemente unidos es lo suficientemente lenta como para permitir la extinción, la clasificación y el análisis mediante procedimientos de mezcla manual. Por lo tanto, se podría emplear una estrategia mediante la cual se hiciera madurar la afinidad de los scFv a través de ciclos de mutagénesis y cribado basado en el equilibrio para alcanzar una $K_D \sim 1$ nM, seguido de ciclos de mutagénesis y cribado de la velocidad de disociación para obtener mejoras adicionales.

La presentación en la superficie celular y el cribado mediante citometría de flujo permiten seleccionar clones de una genoteca en base a parámetros cinéticos de unión tal como la K_D y la constante de velocidad de disociación (k_{diss}). A continuación, los parámetros de unión de los mutantes seleccionados pueden calcularse cuantitativamente *in situ* en el formato de presentación sin necesidad de subclonación o expresión soluble, como se muestra en la figura 17. Por el contrario, la selección de anticuerpos presentados en bacteriófagos suele implicar condiciones cada vez más estrictas de lavado y elución, incluso hasta el punto de un pH 2 y GuHCl 8 M. Tal selección de rigurosidad tiene poca precisión cuantitativa y no siempre se relacionan directamente con parámetros de unión tales como K_D o k_{diss} en condiciones ambientales o fisiológicas.

Se han descrito sistemas de presentación en la superficie celular bacteriana (Gunneriusson *et al.*, 1996) para el diseño de anticuerpos y otras proteínas. Estos sistemas poseen algunas de las ventajas del presente sistema de presentación en levaduras, aunque no proporcionan las capacidades de procesamiento post-traduccionales de la ruta secretora eucariota. El acceso de macromoléculas a la proteína presentada en bacterias también puede quedar restringido por la barrera de difusión que presenta la capa de lipopolisacárido (Roberts, 1996). Por esta razón, no es posible la unión a antígenos proteicos solubles o el marcado de epítomos de identificación con anticuerpos monoclonales. También se dispone de sistemas de presentación en superficie en células de mamífero cultivadas pero la construcción y el cribado de genotecas combinatorias para estos sistemas no son tan rápidos o tan versátiles como para la levadura.

Se cribó una genoteca bastante pequeña (3×10^5) para aislar los mutantes que se describen en el presente documento. Esto no representa un límite superior del tamaño de la genoteca de levadura. Se han construido genotecas de levadura con 10^7 clones y de ser necesario, podrían lograrse aumentos adicionales del tamaño de la genoteca. La presente descripción muestra que puede utilizarse la presentación en la superficie de levaduras para aislar un scFv mutante con una mayor afinidad y que pueden enriquecerse o excluirse los mutantes con epítomos de AcMo modificados, como se desee. Además, puede calcularse la K_D *in situ* en el formato de presentación sin necesidad de subclonación y expresión soluble. La optimización cuantitativa de las condiciones de cribado permitirá mejoras adicionales en este método. Las aplicaciones de la presentación en la superficie de levaduras se amplían más allá de la maduración de la afinidad de anticuerpos, al aislamiento de dominios de unión a partir de genotecas de expresión de ADNc o el aislamiento de ligandos o receptores mutantes basado directamente en parámetros de unión cinética y en equilibrio.

EJEMPLO 33

Capacidad de presentación y expresión del receptor de linfocitos T en el sistema de presentación en levaduras

La presente descripción también se refiere a un nuevo proceso para diseñar el receptor de linfocitos T para que tenga propiedades de unión mejoradas, por ejemplo, a superantígenos o complejos de péptido-MHC. La presente descripción establece un método para la presentación de un receptor de linfocitos T en un formato de genoteca de presentación en superficie de levaduras. Este método puede utilizarse: 1) en general, para expresar polipéptidos que

no se expresan normalmente en la superficie o en levaduras, y 2) más concretamente, para diseñar receptores de linfocitos T de mayor afinidad para un ligando de elección.

El diseño de proteínas no ha alcanzado un nivel de desarrollo que permita el diseño racional y dirigido de una mayor afinidad de unión. Como resultado, se han desarrollado abordajes que identifican mutantes mejorados a partir de grandes poblaciones de mutantes. El abordaje más ampliamente utilizado es la "presentación en bacteriófagos", que se ha utilizado para diseñar anticuerpos, especialmente en forma de anticuerpos "monocatenarios" unidos. Sin embargo, la metodología de presentación en bacteriófagos ha sido incapaz de presentar receptores de linfocitos T monocatenarios (scTCRs) con éxito. Esto es muy probablemente porque el plegamiento de los receptores de linfocitos T monocatenarios aislados es muy ineficaz en ausencia de los demás componentes del complejo CD3 y la maquinaria de plegamiento de proteínas del retículo endoplasmático eucariota; el periplasma bacteriano es incapaz de plegar estos fragmentos de manera eficaz.

El establecimiento de un receptor de linfocitos T presentado en la superficie de levaduras se ilustra en las figuras 19 a 21. Una mejora clave ha sido aislar un receptor de linfocitos T mutante que puede presentarse en este sistema. El receptor de linfocitos T de tipo silvestre no se presenta funcionalmente, como demuestra la ausencia de unión por un anticuerpo (1B2) que es específico para la conformación nativa del receptor de linfocitos T (figura 19). Mediante la mutación del receptor de linfocitos T y el cribado de una genoteca para la unión a 1B2, se identificó un receptor de linfocitos T monocatenario mutante presentado en levaduras. Esto establece un sistema que ahora puede utilizarse para aislar receptores de linfocitos T monocatenarios mutantes con propiedades de unión mejoradas.

La presente descripción proporciona un sistema de presentación en la superficie celular de levaduras que expresa con éxito el receptor de linfocitos T. En segundo lugar, la expresión del receptor de linfocitos T de longitud completa sólo puede conseguirse después de la mutagénesis aleatoria del gen del receptor de linfocitos T y a continuación, la selección mediante citometría de flujo de la expresión en superficie. Este método explota un abordaje evolutivo para "corregir" el defecto de expresión en el receptor de linfocitos T.

Este mismo abordaje podría aplicarse a cualquier polipéptido que en su forma silvestre no se presenta de manera eficaz. La selección de la "capacidad de presentación" se ha puesto en práctica para el receptor de linfocitos T, tal como se describe en los ejemplos 33-37. Una vez que se obtuvieron versiones de mutantes con capacidad de presentación del polipéptido, a continuación pueden someterse estas versiones a los procesos de cribado para las propiedades de unión mejoradas que se describen en los ejemplos 1-32.

Las moléculas de receptores de linfocitos T mejoradas son útiles en tratamientos para el cáncer, la sepsis y enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis, la diabetes o la esclerosis múltiple. Por ejemplo, las formas solubles de los receptores de linfocitos T de alta afinidad podrían actuar como antagonistas de las enfermedades autoinmunitarias perjudiciales dependientes de linfocitos T y con ello proporcionar potenciales tratamientos para estas enfermedades. Se han empleado con éxito estrategias análogas con un receptor soluble del factor de necrosis tumoral (TNF-R) y las formas de este receptor se encuentran en fase de ensayo clínico para el shock séptico y la artritis reumatoide (Moosmayer *et al.*, 1995).

En los métodos de la presente invención, la presentación en la superficie de levaduras permite diseñar receptores de linfocitos T monocatenarios para que se unan con alta afinidad a los superantígenos o complejos de MHC-péptido. Tales moléculas podrían encontrar diversos usos médicos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: 1) interferir con ataques inapropiados de linfocitos T en el tejido sano en enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis, la diabetes y la esclerosis múltiple; 2) interferir con el choque séptico debido a un superantígeno bacteriano que interactúa con los linfocitos T, lo que conduce a reacciones inflamatorias masivas; y 3) destruir las células tumorales que portan ligandos del receptor de linfocitos T (por ejemplo, complejos específicos de péptido tumoral/MHC) utilizando el receptor de linfocitos T de alta afinidad junto con agentes anti-CD3 biespecíficos para redirigir a los linfocitos T para que ataquen a las células cancerosas.

Plásmidos y cepas

El gen de TCR monocatenario (V(8.2-conector- V(3.1) gen unido mediante un conector 205 modificado (Cho *et al.*, 1995) se subclonó mediante PCR en el vector pCR-Script (Stratagene, La Jolla, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se incluyó un epítipo de identificación 6-His en el extremo carboxilo terminal del scTCR para fines de purificación. El fragmento *NheI/XhoI* de ~ 800 pb que contenía el scTCR se escindió del PCR-Script y se ligó en el vector de presentación en superficie de levadura pCT202 que contenía un epítipo de identificación de nueve residuos (HA) y el marco de lectura abierto AGA2 cadena abajo del promotor inducible GAL1. El constructo resultante se transformó mediante el método de transformación con acetato de litio (LiAc) de Gietz y Schiestl (Gietz *et al.*, 1995) en la cepa de *S. cerevisiae* BJ5465 (aura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4::His2 prbD1.6 can1 GAL; Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA) que contenía un AGA1 cromosómicamente integrado controlado por el promotor GAL1 (cepa EBY100).

EJEMPLO 34

Producción de una genoteca aleatoria de mutantes scTCR

Se transformaron aproximadamente 50 ng de pCT202/scTCR en células de *E. coli* XL1-Red (Stratagene, La Jolla, CA) según el protocolo del fabricante. Después de 1 hora de inducción en medio SOC, se centrifugó la recuperación a 2.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en 500 ml de medio LB líquido que contenía 100 mg/ml de ampicilina más 50 mg/ml de carbenicilina (LB-AMP100-CARB50). Se añadió la resuspensión a 15 ml de LB-AMP100-CARB50 en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se cultivó a 37°C con agitación. Se regeneró el cultivo con 15 ml de LB-AMP100-CARB50 de nueva aportación en fase semilogarítmica (DO_{600} 0,2-0,4) y a continuación se hizo crecer hasta la saturación ($DO_{600} \sim 1,0-1,1$; esto se consideró un "ciclo" o ronda de mutación). Se añadió una pequeña fracción de este cultivo (0,75 ml) al siguiente ciclo (15 ml de LB-AMP100-CARB50). Después de seis ciclos de crecimiento, se realizaron preparaciones de plásmido de ADN Wizard® Miniprep (Promega, Madison, WI) en el cultivo de 15 ml. Se transformaron aproximadamente 10 mg de ADN de pCT202/scTCR del sexto ciclo en cada uno de 10 tubos de la cepa de levadura EBY100 utilizando el método LiAc. Se combinaron las 10 reacciones después de la resuspensión en 1 ml de ddH₂O/tubo, se sembró 1/10.000 de la combinación en placas selectivas para determinar la eficacia de transformación. El tamaño de la genoteca fue de aproximadamente 7×10^6 . Se inoculó un volumen de 50 ml de SD-CAA (glucosa al 2% en peso, base nitrogenada de levadura de Difco al 0,67% en peso, casaminoácidos al 0,5% en peso) con el resto del cultivo, cultivado durante toda la noche a 30°C con agitación, se sometieron a pases hasta una $DO_{600} = 0,05$ y se cultivaron durante toda la noche a 30°C hasta una $DO_{600} > 1,0$. A continuación, se inocularon cinco mililitros de medio selectivo con galactosa SG-CAA (en el que la glucosa en el SD-CAA es sustituida por galactosa al 2%) hasta una $DO_{600} = 0,5$ y se cultivaron durante toda la noche a 20°C con agitación durante ~ 20-24 horas (1-2 duplicaciones).

EJEMPLO 35Selección de una genoteca de mutantes scTCR mediante clasificación de células activada por fluorescencia

Se marcaron las células con 25 ml de AcMo 1B2 (anti-Vb8.2Va3.1; preparado a partir de líquido ascítico y conjugado con biotina) a una concentración de 20 mg/ml. Se clasificaron las muestras en un banco de trabajo Coulter 753 con una tasa de acontecimientos de ~ 4.000 células/segundo (Flow Cytometry Center, Centro de Biotecnología de la UIUC). Se examinó un total de 6×10^7 células durante la primera ronda de clasificación, recogiendo ~ 5% de la población. Las células recogidas se volvieron a cultivar entre las clasificaciones a 30°C en 4 ml de medio selectivo con glucosa SD-CAA. Después de ~ 18 a 20 horas, se indujo la expresión recombinante de AGA1 + AGA2-scFv a 20°C con agitación en 5 ml SG-CAA. Se realizó un total de 3 rondas de clasificación, siendo la primera clasificación en modo de enriquecimiento (elevada recuperación de todos los clones positivos) y las 2 últimas clasificaciones en modo de purificación (células negativas coincidentes rechazadas). Inmediatamente después de la última clasificación, las células recogidas se volvieron a clasificar, se recogieron como dos poblaciones separadas ("elevada expresión" y "baja expresión") y se sembraron en placas selectivas para aislar clones individuales. Se examinaron veinte clones mediante citometría de flujo.

EJEMPLO 36Inducción y detección de un mutante scTCR en la superficie de levaduras

Se cultivaron los clones individuales de la clasificación de la genoteca pCT202/scTCR durante toda la noche a 30°C con agitación en 3 ml de SD-CAA seguido de inducción en SG-CAA como se ha descrito anteriormente. Los cultivos se recogieron después de 20-24 horas (1-2 duplicaciones) mediante centrifugación, se lavaron con PBS (NaPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3) que contenía albúmina de suero bovino al 0,1% y azida al 0,05% y se incubaron 45 minutos en hielo con 25 l de 10 mg/ml de AcMo anti-HA 12CA5 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN), o AcMo 1B2 biotinilado (20 mg/ml) preparado a partir de líquido ascítico. Se lavaron las células con PBS y se incubaron 30 minutos en hielo con IgG de cabra anti-F(ab')₂ de ratón marcado con FITC (1:50; Kirkegaard and Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD) o un conjugado de estreptavidina-ficoeritina (SA-PE) (1:100; PharMingen, San Diego, CA). Se analizaron las células de levadura marcadas en un citómetro de flujo Coulter Epics XL. La tasa de acontecimientos fue de ~ 250 células/segundo. Se recogieron los datos para 10.000 acontecimientos y se sometió a selección a la población según la dispersión de luz (tamaño) para evitar el análisis de agregados celulares. Los resultados del TCR de tipo silvestre (wt) y varios mutantes de TCR representativos se muestran en la figura 19. También se construyeron mutantes dobles que contenían mutaciones combinadas de varios de estos aislamientos y los resultados de la citometría de flujo de éstos se muestra en la figura 20.

EJEMPLO 37Rescate y secuenciación de genes de scTCR mutantes

Se rescataron los plásmidos de la levadura scTCR (wt y 20 mutantes) según el protocolo descrito por Ward (Ward, 1991), salvo que las células se rompieron con un homogenizador tipo "bead beater" (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK) durante 2 minutos en lugar de agitación en vórtex. Se centrifugaron las células durante 1 minuto y se recogió la fase superior (acuosa). Se utilizó un kit Wizard® DNA Clean-Up (Promega, Madison, WI) para preparar

el ADN de plásmido y se transformaron células competentes ElectroMAX[®] de *E. coli* DH5 α (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) por medio de electroporación con 1 ml de la preparación de ADN. Las transformaciones se sembraron en LB-AMP50. Se llevó a cabo la secuenciación de wt scTCR y 20 mutantes (mTCR1-mTCR20) utilizando cebadores que flanqueaban el scTCR del vector de presentación y secuenciación automatizada fluorescente (Genetic Engineering Facility del Centro de Biotecnología de la UIUC). Se encontraron mutaciones individuales en el TCR para cada uno de los aislados mostrados (figura 21).

EJEMPLO 38

Presentación en superficie y expresión soluble de mutantes de TCR simples, dobles y triples

Los mutantes para un solo sitio incluían los siguientes residuos: VaL43P (mTCR7), VaL104P (mTCR16) y VbG17E (mTCR15). La combinación de estas mutaciones en los mutantes dobles o triples produjo la presentación en superficie del scTCR a niveles aún más elevados.

Para examinar los scTCR mutantes seleccionados mediante la presentación en la superficie de levaduras con más detalle, se clonaron mutantes simples (mTCR7, mTCR15, mTCR16), dobles (mTCR7/15, mTCR7/16, mTCR15/16) y triples (mTCR7/15/16) en un plásmido de secreción de levadura, con una región pre-pro sintética basada en una secuencia de señal de consenso (Clements *et al.*, 1991) bajo el control del promotor inducible *GAL 1-10*. Se expresaron los constructos en levaduras y se monitorizaron los sobrenadantes resultantes en un ensayo de unión a 1B2 cuantitativo como una medida de la proteína TCR correctamente plegada. Los niveles de expresión de los mutantes scTCR activos para 1B2 varió desde niveles indetectables para el scTCR de tipo silvestre hasta el mutante triple, que expresaba los niveles más elevados (figura 22). El orden de los niveles de secreción fue: mutante triple > mutantes dobles > mutantes simples > tipo silvestre. Los mutantes dobles de scTCR seleccionados se purificaron por afinidad utilizando una columna de anticuerpos anti-TCR (KJ16-Affigel) y se encontró que los niveles absolutos de secreción utilizando el sistema de expresión de bajo número de copias eran de aproximadamente 100 mg/l.

EJEMPLO 39

Comparación de la secreción de TCR y los niveles de presentación en superficie

Con el fin de comparar directamente los niveles secretados del scTCR en este sistema con los niveles de TCR expresados en el sistema de presentación en superficie, se examinaron los mismos mutantes como fusiones de Aga-2 en levadura, mediante citometría de flujo. Se marcaron los scTCR presentados en la superficie de levaduras con el anticuerpo anti-HA seguido de un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína y el 1B2 biotinilado, seguido de estreptavidina-ficoeritrina. Se monitorizó la intensidad de la fluorescencia resultante de las poblaciones de levaduras mediante citometría de flujo y se determinó como la media de las unidades de fluorescencia (figura 23A). El nivel de fluorescencia varió entre los mutantes simples, dobles y triples, pero los niveles relativos fueron exactamente los mismos que con el sistema de secreción de levaduras (figura 23B) (es decir, mutante triple > mutantes dobles > mutantes simples > tipo silvestre). Por lo tanto, el sistema de presentación en levaduras era capaz de identificar aquellos mutantes de TCR que se producirían en un sistema de expresión secretable a niveles elevados, seleccionando simplemente aquellos que se expresaban a niveles más elevados en la superficie de levaduras.

EJEMPLO 40

Estabilidad térmica de los TCR solubles

Con el fin de explorar la propiedad de las proteínas que podría regir los niveles de secreción (y presentación) para los scTCR mutantes, se investigó la estabilidad del scTCR mutante llevando a cabo la desnaturalización térmica. Se incubaron los sobrenadantes de ScTCR de levadura a diversas temperaturas durante una hora y se monitoreó la actividad de la proteína como el porcentaje de actividad de 1B2 que quedaba. Debido a que el scTCR de tipo silvestre no se expresaba en el sistema de levaduras, se utilizó para la comparación un scTCR de tipo silvestre replegado a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*. Este scTCR se utilizó como proteína de fusión tiorredoxina (TRX-TCR), que se prevé que aumente la estabilidad y la solubilidad de una proteína. Los resultados mostraron que los mutantes simples tenían mayores temperaturas de desnaturalización térmica que el TRX-TCR (figura 24A). Además, los mutantes dobles y triples eran aún más estables, con temperaturas incluso mayores de desnaturalización que el TCR de tipo silvestre o los mutantes simples (figura 24A).

Se determinó la cinética de desnaturalización térmica para los scTCR mutantes a 46°C con el fin de comparar las velocidades de desnaturalización con cada mutante (figura 24B). Una vez más, se monitorizaron los sobrenadantes de scTCR de levadura y su actividad de unión a 1B2 para determinar la actividad de TCR que se mantenía después de la incubación durante diversos tiempos. La velocidad para la desnaturalización térmica era la mayor para el TRX-TCR y la menor para el mutante triple, quedando los mutantes simples y dobles en la velocidad intermedia (figura 24B). El TCR15/16 purificado por afinidad tenía una cinética de desnaturalización térmica similar a

la determinada para mTCR15/16 medida directamente en los sobrenadantes de cultivo de levadura. Esto indica que las proteínas endógenas de levadura presentes en los sobrenadantes no influyen en la cinética de desnaturalización medida.

5 Se observó una correlación directa cuando se representaron las cantidades de TCR natural que quedaban después de una hora a 48°C en función los niveles de secreción para los scTCR mutantes (necesita la figura 4 de Shusta *et al.* = figura 25). Por lo tanto, en el caso del TCR, la propiedad intrínseca de estabilidad era un indicador fiable de la eficacia de secreción y se correlacionaba directamente con los niveles en la superficie de células de levadura del TCR. Debido a esta correlación, el sistema de presentación puede utilizarse, seleccionando los niveles
10 en superficie más elevados de una proteína, para aislar las proteínas mutantes que presentan una estabilidad aumentada.

EJEMPLO 41

15 Modificación post-traducciona l y presentación en levaduras

Los métodos de la presente invención han identificado variantes del 2C scTCR que se expresan fácilmente en levaduras y presentan estabilidad térmica significativamente mejorada. De hecho, los mutantes de sitio único identificados convertían lo que normalmente es un scTCR inestable en un scTCR que parecía ser tan estable como
20 los fragmentos de anticuerpos monocatenarios (scFv) químicamente entrecruzados o "estabilizados" mediante disulfuros covalentemente. Esto es especialmente importante para el TCR, que tiene potencial como antagonista en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Como el TCR de tipo silvestre expresado de forma heteróloga ha sido anteriormente muy inestable, será importante la farmacocinética a temperatura fisiológica.

25 Se ha demostrado que la glicosilación puede dar lugar a un aumento de la secreción y la estabilidad térmica de las proteínas. Por ejemplo, la glucoamilasa era menos estable como forma no glicosilada producida en *E. coli* que la forma glicosilada producida en levaduras *S. cerevisiae*. Por lo tanto, era posible que las estabilidades de los scTCR producidos en levaduras, que tienen un sitio de glicosilación ligado a N en la región V α , fueran mayores que las del TRX-TCR no glicosilado producido en *E. coli*. Sin embargo, es poco probable que esta sea la única explicación, ya
30 que los mutantes dobles y triples tienen una estabilidad aumentada frente a los mutantes simples y ambas especies están glicosiladas. Además, no se detectó expresión del scTCR de tipo silvestre en levaduras, a pesar de que también se esperaba que estuviera glicosilado.

35 Los niveles de expresión de los diversos scTCRs mutantes en el sistema de secreción de correlacionaron completamente con el nivel de TCR en la superficie en el sistema de presentación en levaduras. Esta relación puede surgir del hecho de que ambos sistemas necesitan el mismo aparato secretor. Por consiguiente, las mutaciones que influyen en el plegamiento y la estabilidad de las proteínas pueden influir en las mismas etapas de transporte de proteínas al exterior (es decir, superficie celular o secretadas). Esta es una clara ventaja de expresar proteínas eucariotas en levaduras (en comparación con los bacteriófagos o las bacterias), ya que existen mecanismos de
40 control de calidad para garantizar que sólo las proteínas correctamente plegadas atraviesen toda la vía de exocitosis.

45 Los niveles de expresión del scTCR mutante también se correlacionaban con las velocidades de desnaturalización térmica. Este efecto es similar a los observados con el inhibidor de tripsina pancreática bovina, en el que las mutaciones que dieron como resultado estabilidades aumentadas también condujeron a aumentos en los niveles de secreción en levaduras. Esta correlación apoya la teoría de que una proteína que tiene una estabilidad aumentada en la forma plegada es más probable que sea empaquetada y exportada de manera apropiada desde la célula en lugar de ser retenida y degradada por la maquinaria de control de calidad eucariota. Por supuesto, también juegan un papel importante muchos otros factores, tales como la velocidad de avance del plegamiento, la formación de enlaces disulfuro y la asociación con los asistentes de plegamiento de proteínas del retículo endoplasmático. Sin embargo, como demuestra la presente invención, la estabilidad térmica parece ser una buena medida de la competencia para la secreción para una molécula anteriormente inestable y mal secretada como el TCR.

55 En base a los resultados presentados en el presente documento, se podría imaginar una metodología mediante la cual una proteína que se expresa mal y/o es inestable puede evolucionar sistemáticamente para expresarse a niveles más elevados y/o como una molécula más estable. El gen que codifica la proteína puede mutarse al azar y la genoteca expresarse en la superficie de levaduras. Una vez presentada, puede cribarse la población en busca de clones que presenten concentraciones elevadas de superficie (fluorescencia media elevada debido a una sonda específica). Como se ha demostrado con el scTCR, aquellas variantes con una expresión en superficie mejorada
60 tienen el potencial de ser moléculas más estables que se expresan a niveles elevados. Por consiguiente, la presentación en la superficie de levaduras puede ser una herramienta poderosa para aumentar la estabilidad de las proteínas para aplicaciones médicas, industriales y de cristalización.

65 En el presente documento se citaron las siguientes referencias:

Bassolino-Klimas, D., *et al.*, Protein Science 1:1465-1476, 1992.

- Baumgartner, J-D, *et al.*, Immunobiol. 187:464-477,1993.
 Berek, C., *et al.*, Immunol Rev. 96:23-41, 1987.
 Bird, R.E., *et al.*, Science 242:423-426,1988.
 Born, *et al.*, (1987) J. Immunol. 138, 999.
 5 Brodnicki, *et al.*, (1996) Mol. Immunol. 33, 253-263.
 Brummell, D.A., *et al.*, Biochemis. 32:1180-1187, 1993.
 Cappellaro, C., *et al.*, EMBO Journal 13:4737-4744, 1994.
 Chang *et al.*, (1994) PNAS USA 91:11408-11412.
 Cho, *et al.*, (1997) Bioconj. Chem. 8, 338-346.
 10 Cho, *et al.*, (1995) J. Biol. Chem. 270, 25819-25826.
 Choo, Y., & Klug, A. (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6, 431-436.
 Clackson, T., *et al.*, Nature 352:624-628, 1991.
 Clements, *et al.*, (1991) Gene 106:267-271.
 Daniels, D. A., & Lane, D. P. (1996) Methods 9,494-507.
 15 Davis, G.T., *et al.*, Biotechnology 9:165-169,1991.
 de Nobel, H., *et al.*, Trends in Cell Biol. 4:42-45,1994.
 Deng, S., *et al.*, J. Biol. Chem. 269:9533-9538, 1994.
 Denzin, L.K., *et al.*, Mol. Immunol. 30:1331-1345, 1993.
 DiRienzo, J.M., *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 47: 481-532, 1978.
 20 Droupadi, P.R., *et al.*, J. Mol. Recog. 5:173-179,1993.
 Eilat *et al.*, (1992) PNAS USA 89:6871-6875.
 Eilman, *et al.*, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2779-2782.
 Engel *et al.*, (1992) Science 256:1318-1321.
 Fischman, A.J., *et al.*, J. Nucl. Med.. 34:2253-2263, 1993.
 25 Foote, J., *et al.*, Nature 352: 530-532, 1991.
 Francisco, S.A., *et al.*, PNAS 90:10444-10448,1993.
 Garrard, L.J., *et al.*, Gene 128: 103-109, 1993.
 Georgiou, *et al.*, (1997) Nat. Biotechnol. 15, 29-34.
 Gilli, P., *et al.*, J. Phys. Chem. 98:1515-1518, 1994.
 30 Gilson, M.K., *et al.*, Proteins:Struc., Func., Genet. 3:32-52, 1988.
 Goldenberg, D.M. *et al.*, Am. J. Med. 94:297312,1993.
 Goldenberg, D.M., *et al.*, Int. J Oncol. 3:5-11, 1993.
 Greener, A., *et al.*, Strat. in Mol Biol. 7: 32-34, 1994.
 Guddat, L.W., *et al.*, J. Mol. Biol. 236:247-274, 1994.
 35 Gunther, R., *et al.*, J. Biol Chem. 268: 7728-7732, 1993.
 Hammond, C., Helenius, A. Curr. Opin. Cell Biol. 5:523-529, 1995.
 Hand, P.H., *et al.*, Cancer 73:1105-1113,1994.
 Hawkins, R.E., *et al.*, J. Mol Biol 234; 958-964,1993.
 Hawkins, R.E., *et al.*, Mol. Biol. 226: 889-896, 1992.
 40 Herron, J.N., *et al.*, Biochemistry 25:4602-4609, 1986.
 Hibbits, K.A., *et al.*, Biochemistry 33:3584-3590,1994-
 Hilzemann, R. TIPS 9:408-411, 1988.
 Holland, J.I. Adaptation in Natural and Artificial Systems , MIT Press, Cambridge, 1992.
 45 Holst, M., *et al.*, Proteins: Struct., Func., & Gen. 18:231-245, 1994.
 Horwitz, A.H., *et al.*, PNAS 85: 8678-8682, 1988.
 Huse, W.D., *et al.*, Science 246: 1275-1291, 1989.
 Huston, J.S., *et al.*, PNAS 85:5879, 1988.
 Ishikawa, E., *et al.*, J. Clin. Lab. Anal. 7:376-393, 1993.
 Johnsson, N., *et al.*, Cell, in press, 1994.
 50 Johnston, M., *et al.*, Mol. Cell. Biol. 4:1440-1448, 1984.
 Kang, A.S., *et al.*, PNAS 88:11120-11123, 1991.
 Kappler *et al.*, (1994) PNAS USA 91:8462-8466.
 Kelley, R.F., *et al.*, Biochemistry 32:6828-6835, 1993.
 Kozack, R.E., *et al.*, Protein Sci. 2:915-926, 1993.
 55 Kranz, D.M., *et al.*, J. Biol. Chem. 257:6987-6995, 1982.
 Kricka, L.J. J. Clin. Immunoassay 16:267-271, 1993.
 Lipke, P.N., *et al.*, Microbiol, Rev. 56:180-194, 1992.
 Low, N. M., *et al.*, J. Mol. Biol. 260:359-368, 1996.
 Lu, C.-F., *et al.*, J. Cell Biol. 128:333-340, 1995.
 60 Mallender, W.D., *et al.*, J. Biol Chem. 269: 199-206, 1994.
 Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M., Ward, A.C. Nucl. Acids. Res. 18:5319, '1991.
 Winter, G. "By-Passing Immunization: Building High Affinity Human Antibodies by Chain Shuffling." Biotechnology 10:779-783,1992.
 65 Marks, J.D., *et al.*, J. Biol Chem. 267: 16007-16010, 1992.
 McKearn, T.J. Cancer 71:4302-4313, 1993,

- Miettinen, M. *Ann. Med.* 25:221-233, 1993.
Moks, T., *et al.*, *Biochemistry* 26:5239-5244, 1987.
Mukkur, T.K.S. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16:133-167, 1984.
Muller, G.W., *et al.*, *J. Med. Chem.* 35:740-743, 1992.
5 Near, R.I., *et al.*, *Mol Immunol*, 30: 369-377, 1993.
Necker *et al.*, (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:3035-3040.
Nell, L.J., *et al.*, *Biopolymers* 32i 1 1-21, 1992.
Normington, K., *et al.*, *Cell* 57:1223-1236, 1999.
Novotny *et al.*, (1991) *PNAS USA* 88:8646-8650.
10 Omelyanenko, V.G., *et al.*, *Biochemistry* 32:10423-10429, 1993.
Riechmann, L., *et al.*, *Biochemistry* 32:8848-8855, 1993,
Riechmann, L., *et al.*, *Mol Biol.* 224:913-918, 1992.
Roberets, S., *et al.*, *Nature* 328:731-734, 1987.
Roy, A., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11:4196-4206, 1991.
15 Rumbley, C.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 13667-13674, 1993.
Schreuder, M. P., *et al.*, *Yeast* 9:399-409, 1993.
Schreuder, M. P., *et al.*, *Trends Biotechnol.* 14:115-120, 1996.
Searle, M.S., *et al.*, *Anal de Quimica* 89:17-26, 1993.
Serafini, A.N. *J. Nucl. Med.* 34:533-536, 1993.
20 Sigurskjold, B.W., *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 197:239-246, 1991.
Slanetz *et al.*, (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:179-183.
Soo Hoo *et al.*, (1992) *PNAS USA* 89:4759-4763.
Stemmer, W.P.C. *Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10747-10751, 1994 a.
Stemmer, W.P.C. *Nature* 370:389-391, 1994 b.
25 Stemmer, W.P.C. *et al.*, *BioTechniques* 4:256-265, 1993.
Ward, M., *et al.*, *Biotechnology* 8:435-440, 1990.
Ward *et al.* (1991) *Scand. J. Immunol.* 34:215-220.
Williams, D.H., *et al.*, *PNAS* 90:1172-1178, 1993.
Wood, C.R., *et al.*, *Nature* 314:446-449, 1985.
30 Wulfing *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 242:655-669.
Yaimush, M., *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.* 10:197-252, 1993.
Yarmush, M.L., *et al.*, *Biotech. Adv.* 10:413-446, 1992.
Zaccolo, M., *et al.*, *Int. J. Clin. Lab. Res.* 23:192-198, 1993.
Zebedee, S.L., *et al.*, *PNAS* 89-3175-3179, 1992.
35 Gietz, *et al.*, (1995) *Yeast* 11, 355-360.
Gunneriusson, *et al.*, (1996) *J. Bacteriol.* 178, 1341-1346.
Hoogenboom, H. R. (1997) *Trends Biotechnol.* 15, 62-70.
Knappik, A., & Pluckthun, A. (1995) *Prot. Eng.* 8, 81-89.
Kretzschmar, *et al.*, (1995) *Anal. Biochem.* 224, 413-419.
40 Ladner, R. C. (1995) *Trends Biotechnol.* 13, 426-430.
Lowman, *et al.*, (1991) *Biochemistry* 30, 10832-10838.
Markland, *et al.*, (1996) *Methods Enzymol.* 267, 28-51.
Matthews, D. J., & Wells, J. A. (1993) *Science* 260, 1113-1117.
McDuffie, *et al.*, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8728.
45 Patten, *et al.*, (1996) *Science* 271, 1086-1091.
Petsko, G. (1996) *Nature* 384 (Supplement), 7-9.
Phizicky, E. M., & Fields, S. (1995) *Microbiol. Rev.* 59, 94-123.
Rabinowitz, *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1401-1405.
Roberts, I. S. (1996) *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 285-315.
50 Rode, *et al.*, (1996) *Biotechniques* 21, 650.
Roehm, *et al.*, (1985) *J. Immunol.* 135, 2176.
Schier, *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 263, 551-567.
Schlueter, *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 256, 859-869.
Schodin, *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 33, 819-829.
55 Thompson, *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 256, 77-88.
Ulrich, H. D., Patten, P. A., Yang, P. L., Romesberg, F. E., & Schultz, P. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11907-11911.
Walker, K. W., & Gilbert, H. F. (1994) *J. Biol. Chem* 269, 28487-28493.
Wang, C. I., Yang, Q., *et al.* (1996) *Methods Enzymol.* 267, 52-68.
60 Yang, *et al.*, (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 392-403.
Yelton, *et al.*, (1995) *J. Immunol.* 155, 1994-2004.

Cualquier patente o publicación mencionada en la presente memoria descriptiva es indicativas de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

65 Un experto en la materia comprenderá fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a

cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos intrínsecos a la misma. Los presentes ejemplos, junto con los métodos, procedimientos, moléculas y compuestos específicos descritos en el presente documento son actualmente representativos de las formas de realización preferentes.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Wittrup *et al.*
- <120> Presentación de proteínas en la superficie de células de levadura y sus usos
- <130> D6061PCT
- 10 <141> 20-01-1999
- <150> 09/009,388
- <151> 20-01-1998
- <160> 26
- <170> WORD 6.0.1 para Macintosh
- 15 <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- 20 <223> Epítipo de identificación
- <400> 1

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
5

- <210> 2
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Desconocido
- 35 <220>
- <223> Epítipo de identificación
- <400> 2

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
5 10

- <210> 3
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Desconocido
- 50 <220>
- <223> Epítipo de identificación
- <400> 3

Asp Thr Tyr Arg Tyr Ile
5

- <210> 4
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Desconocido
- 65 <220>
- <223> Epítipo de identificación

<400> 4

5

Thr Asp Phe Tyr Leu Lys

5

10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Desconocido

15

<220>

<223> Epítipo de identificación

<400> 5

20

Glu Glu Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu

5

25

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Desconocido

30

<220>

<223> Epítipo de identificación

<400> 6

35

Lys Pro Pro Thr Pro Pro Pro Glu Pro Glu Thr

5

10

40

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Desconocido

45

<220>

<223> Epítipo de identificación

<400> 7

50

His His His His His His

5

55

60

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

65

<223> Epítipo de identificación

<400> 8

Arg Tyr Ile Arg Ser

5

5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> Epítipo de identificación
<400> 9

10

15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

5

20

<210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR hacia el gen AGA2 de *S. cerevisiae*
<400> 10

25

30

attagaattc cctactcat acatttcaa 30

<210> 11
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador de PCR hacia el gen AGA2 de *S. cerevisiae*
<400> 11

40

attactcgag ctattactgc agagcgtagt ctggaacgtc gtatgggtaa 60
aaaacatact gtgtgtttat ggg 73

45

<210> 12
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR hacia la secuencia de reconocimiento del factor Xa
<400> 12

50

55

tcgacgattg aaggtagata cccatacgcac gttccagact acgctctgca 50
gtaatagatt atcctcgagc t 71

60

<210> 13
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

65

ES 2 451 091 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector entre los productos de PCR para mantener el marco de lectura correcto
 <400> 20

5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 5 10 15

10

<210> 21
 <211> 1172
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Productos de PCR clonados para producir el casete del gen AFA2-HA-4-4-20
 <400> 21

15

20

attagaattc cctacttcat acattttcaa ttaagatgca gttacttcgc 50
 tgtttttcaa tattttctgt tattgcttca gtttttagcac aggaactgac 100
 aactatatgc gagcaaatcc cctcaccaac tttagaatcg acgccgtact 150
 ctttgtcaac gactactatt ttggccaacg ggaaggcaat gcaaggagt 200
 tttgaatatt acaaatcagt aacgtttgtc agtaattgcg gttctcacc 250
 ctcaacaact agcaaaggca gccccataaa cacacagtat gtttttaagg 300
 acaatagctc gacgattgaa ggtagatacc catacgacgt tccagactac 350
 gctctgcagg ctagcgacgt cgttatgact caaacaccac tatcacttcc 400
 tgttagtcta ggagatcaag cctccatctc ttgcagatct agtcagagcc 450
 ttgtacacag taatggaaac acctatttac gttggtacct gcagaagcca 500
 ggccagtctc caaaggctct gatctacaaa gtttccaacc gattttctgg 550
 ggtcccagac aggttcagtg gcagtggtac agggacagat ttcacactca 600
 agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gagtttattt ctgctctcaa 650
 agtacacatg ttccgtggac gttcgggtgga ggcaccaagc ttgaaattaa 700
 gtcctctgct gatgatgcta agaaggatgc tgctaagaag gatgatgcta 750
 agaaagatga tgctaagaaa gatggtgacg tcaaactgga tgagactgga 800
 ggaggcttgg tgcaacctgg gaggcccatg aaactctctt gtggtgctc 850
 tggattcact tttagtgact actggatgaa ctgggtccgc cagtctccag 900

55

agaaaggact ggagtgggta gcacaaatta gaaacaaacc ttataattat 950
 gaaacatatt attcagattc tgtgaaaggc agattcacca tgtcaagaga 1000
 tgattccaaa agtagtgtct acctgcaaat gaacaactta agagttgaag 1050
 acatgggtat ctattactgt acgggttctt actatggtat ggactactgg 1100
 ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca gaacaaaagc ttattttctga 1150
 agaagacttg taatagctcg ag 1172

65

ES 2 451 091 T3

<210> 22
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Productos de PCR de scFv-KJ16 de tipo silvestre
<400> 22

5

10

15

20

25

```
gacgtcctgg tgacccaaac tcctgectcc ctgtctgcat ctccggatga 50
atctgtcacc atcacatgcc aggcaagcca ggacattggg acttcgttag 100
tttggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt 150
gcaactatct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtagatc 200
tggcacacag tattctctta agatcaacag actacagggt gaagatattg 250
gaacctatta ctgtctacag gtttctagtt ctccgtacac gtttggagct 300
ggcaccaagc tggagctcaa acggctctca gaacaaaagc ttatttccga 350
agaagatttg tagtaa 366
```

30

<210> 23
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Productos de PCR de KJ16-mut4
<400> 23

35

40

45

50

```
gacgtcctgg tgacccaaac tcctgectcc ctgtctgcat ctccggatga 50
atctgtcacc atcacatgcc aggcaagcca ggacattggg acttcgttag 100
tttggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt 150
gcaactatct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtagatc 200
tggcacacag tattctctta agatcaacag actacagggt gaagatattg 250
gaacctatta ctgtctacag gtttctagtt ctccgtacac gtttggagct 300
ggcaccaagc tggagctcaa acggctctca gaacaagagc ttatttccga 350
agaagatttg tagtaa 366
```

55

<210> 24
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Productos de PCR de KJ16-mut7
<400> 2,4

60

65

ES 2 451 091 T3

5 gacgtcctgg tgacccaaac tectgcctcc ctgtctgcat ctccggatga 50
 atctgtcacc atcacatgcc aggcacgcc ggacattggg acttcgtag 100
 tttgggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt 150
 gcaactatct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtaaadc 200
 10 tggcacacag tattctctta agatcaacag actacagggt gaagatattg 250
 gaacctatta ctgtctacag gtttctagtt ctccgtacac gtttggagct 300
 ggcaccaagc tggagctcaa acggctctca gaacaaaagc ttatttccga 350
 15 agaagatttg tagtaa 366

20 <210> 25
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia que muestra las mutaciones en el receptor de linfocitos T
 25 <400> 25

30 gacgtcgcag tcacccaaag cccaagaaac aagggtggcag taacaggagg 50
 aaagggtgaca ttgagctgta atcagactaa taaccacaac aacatgtact 100
 ggtatcggca ggacacgggg catgggctga ggctgatcca ttattcatat 150
 35 ggtgctggca gcactgagaa aggagatata cctgatggat acaaggcctc 200
 cagaccaagc caagagaact tctccctcat tctggagttg gctaccccct 250
 ctcagacatc agtgtacttc tgtgccagcg gtgggggggg caccttgtac 300
 40 tttgggtgcg gcacccgact atcgggtgcta tectccgcg atgatgctaa 350
 gaaggatgct gctaagaagg atgatgctaa gaaagatcat gctaagaaag 400
 atgcacagtc agtgacacag cccgatgctc gcgtcactgt ctctgaagga 450
 45 gcctctctgc agctgagatg caagtattcc tactctgcga caccttatct 500
 gttctgggat gtccagtacc cgcggcaggg gctgcagctg ctctcaagt 550
 actattccgg agaccagtg gttcaaggag tgaatggctt tgaggctgag 600
 50 ttcagcaaga gcaactcttc ctccacctg cggaaagcct cctgactg 650
 gagcgaactcg gctgtgtact tctgtgctgt gagcggcttt gcaagtgcgc 700
 55 tgacatttgg atctggcaca aaagtcattg ttctaccata catctag 747

60 <210> 26
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Epítipo de identificación
 <400> 26
 65 lle Glu Gly Arg

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para seleccionar proteínas con propiedades fenotípicas mejoradas con respecto a las de esa proteína de tipo silvestre, que comprende las etapas de:
- transformar las células de levadura con un vector que expresa una proteína a ensayar fusionada a una proteína de pared celular de levadura, en el que se utiliza la mutagénesis para generar una población variegada de mutantes de la proteína a ensayar;
- 10 marcar dichas células de levadura con un primer marcador, en el que dicho primer marcador se asocia con las levaduras que expresan dicha proteína a ensayar y no se asocia con las levaduras que no expresan dicha proteína a ensayar;
- aislar dichas células de levadura con las que se asocia dicho primer marcador;
- 15 analizar y comparar dichas propiedades fenotípicas de dicha proteína mutante expresada por una levadura que tiene las propiedades fenotípicas de dicha proteína de tipo silvestre; y
- seleccionar las células de levadura que presentan las proteínas mutantes con propiedades fenotípicas mejoradas frente a la proteína de tipo silvestre;
- en el que las propiedades fenotípicas mejoradas son una o más de entre el nivel de expresión en superficie, la estabilidad, los niveles de secreción y la solubilidad.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína a ensayar es un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo Fab, Fv o scFv.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína a ensayar es el dominio de unión a ligando de un receptor de superficie celular.
- 25 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho receptor de superficie celular es un receptor de linfocitos T.
5. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína a ensayar está fusionada por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de dicha proteína de pared celular de levadura.
- 30 6. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína de pared celular de levadura es una aglutinina.
7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha levadura es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*.
- 35 8. Método según la reivindicación 1, en el que dichos mutantes de la proteína a ensayar están seleccionados del grupo que consiste en mutantes simples y mutantes múltiples.
9. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer marcador está seleccionado del grupo que consiste en marcadores fluorescentes y partículas magnéticas fijadas a un ligando para la proteína a ensayar.
- 40 10. Método según la reivindicación 1, en el que la selección de las proteínas mutadas de interés con propiedades fenotípicas mejoradas implica ciclos iterativos de dichas etapas de transformación y de puesta en contacto.
- 45 11. Método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente las etapas de:
- poner en contacto dichas células de levadura con un segundo marcador, en el que dicho vector utilizado para transformar dichas células de levadura contiene medios para expresar una secuencia polipeptídica fusionada a dicha proteína a ensayar para producir un polipéptido de fusión y dicho segundo marcador se asocia con
- 50 las células de levadura que expresan dicho polipéptido de fusión y no se asocia con las células de levadura que no expresan dicho polipéptido de fusión;
- enriquecer una población de levaduras transformadas cuantificando dicho segundo marcador, en el que una presencia de dicho segundo marcador es directamente proporcional a la abundancia de dichos polipéptidos de fusión expresados en la superficie celular; y
- 55 comparar dicha cuantificación de dicho primer marcador con dicha cuantificación de dicho segundo marcador para determinar los niveles de expresión en superficie de dicha proteína a ensayar.
12. Método según la reivindicación 11, en el que puede utilizarse un aumento de dichos niveles de expresión en superficie de dicha proteína mutante a ensayar con respecto al nivel de expresión en superficie de la proteína de tipo silvestre ensayada para seleccionar las propiedades fenotípicas deseables de dicha proteína mutante, en el que dichas propiedades fenotípicas deseadas incluyen una o más de entre el nivel de expresión intracelular, la estabilidad, los niveles de secreción y la solubilidad.
- 60 13. Método según la reivindicación 11, en el que dicha porción polipeptídica de dicho polipéptido de fusión reconocida por dicho segundo marcador es un epítipo de identificación.
- 65

14. Método según la reivindicación 11, en el que dicho primer marcador y dicho segundo marcador son marcadores fluorescentes.

5 15. Método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente las etapas de:

clonar un gen que codifica dichas proteínas mutantes seleccionadas en un vector adaptado para la expresión en una célula eucariota; y
expresar dicha proteína mutante en dicha célula eucariota, en el que dichas propiedades fenotípicas mejoradas de dicha proteína mutante se confirman comparando las propiedades de dichas propiedades fenotípicas mejoradas de dicha proteína mutante con las propiedades de dicha proteína de tipo silvestre.

10 16. Método según la reivindicación 15, en el que dicha célula eucariota está seleccionada del grupo que consiste en células de levadura, de insecto y de mamífero.

15 17. Método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente las etapas de:

clonar un gen que codifica dichas proteínas mutantes seleccionadas en un vector adaptado para la expresión en un procarionta; y
expresar dicha proteína mutante en dicho procarionta, en el que dichas propiedades fenotípicas mejoradas de dicha proteína mutante se confirman comparando las propiedades de dichas propiedades fenotípicas mejoradas de dicha proteína mutante con las propiedades de dicha proteína de tipo silvestre.

20 18. Método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de aislamiento se lleva a cabo mediante citometría de flujo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

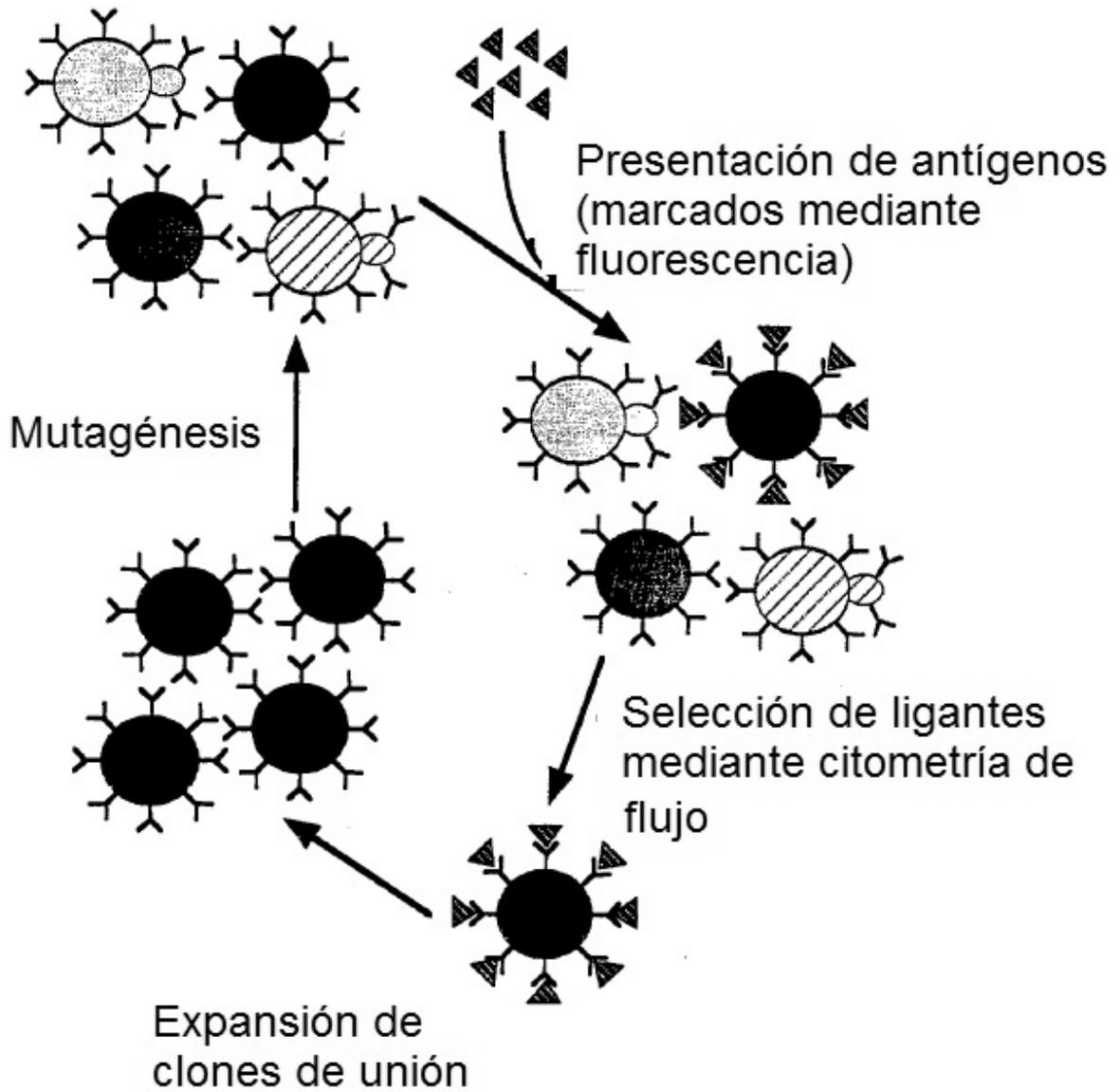


FIG. 1

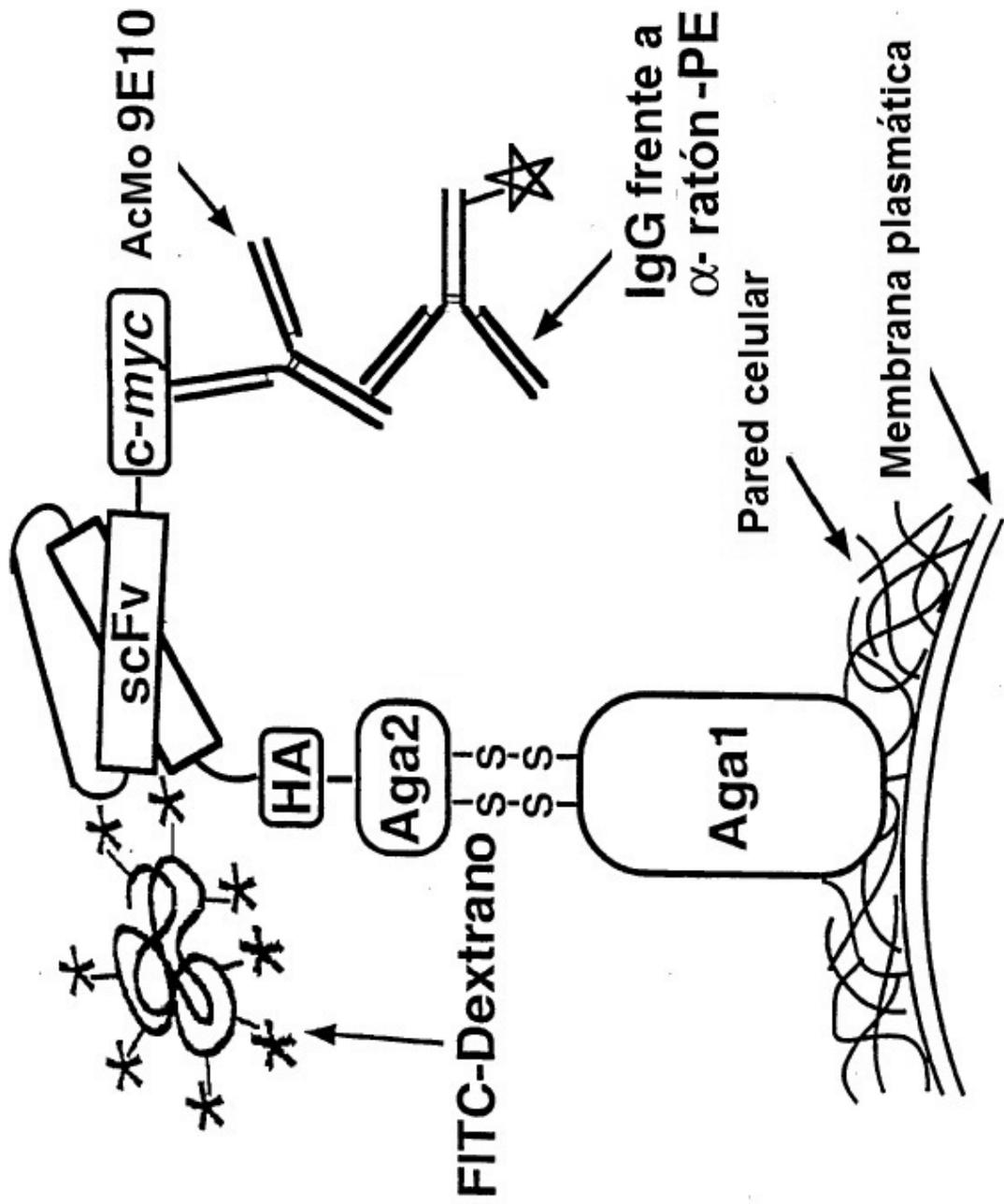


FIG. 2

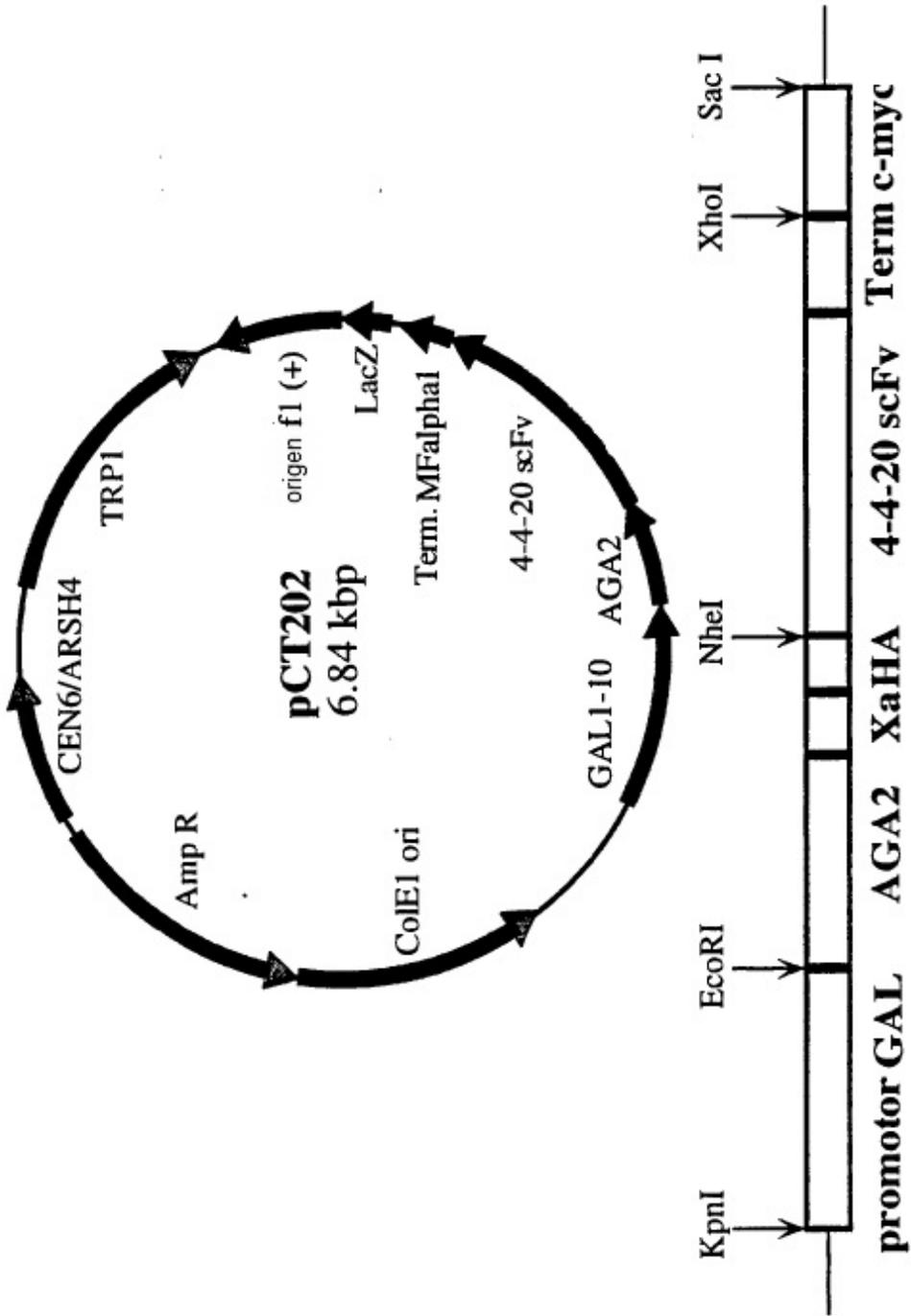


FIG. 3

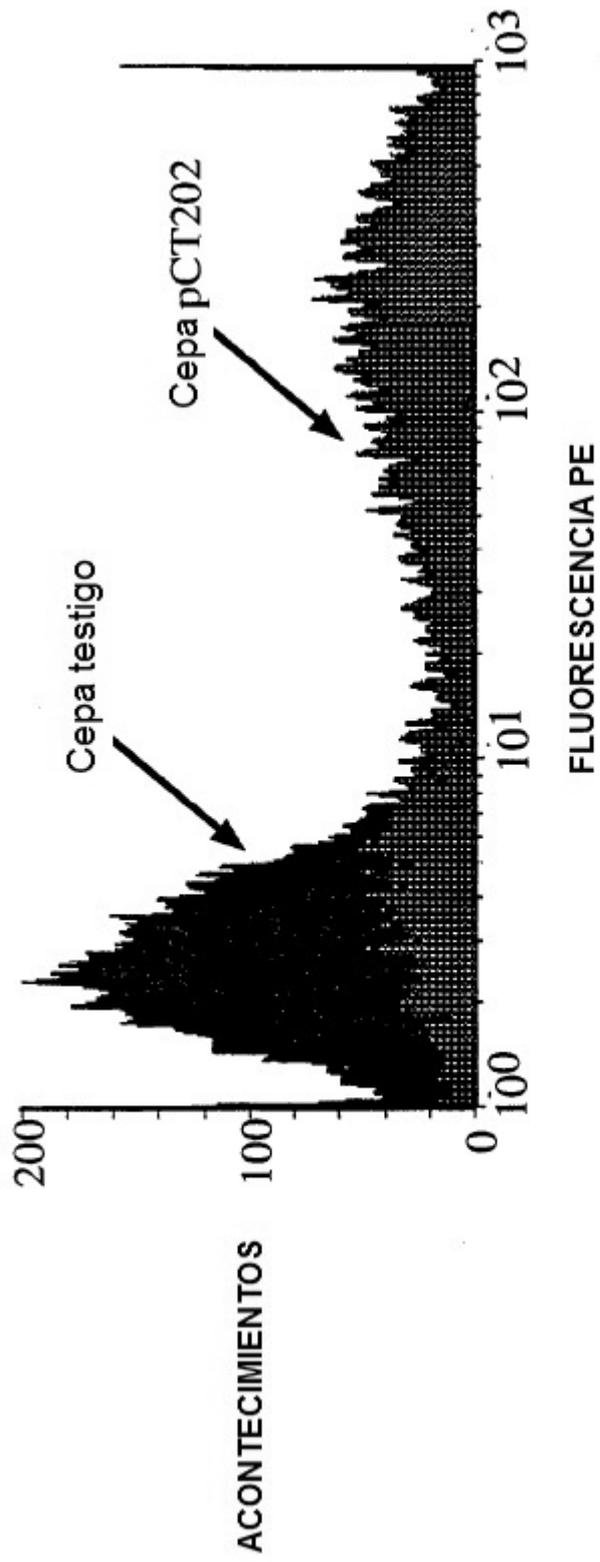


FIG.4

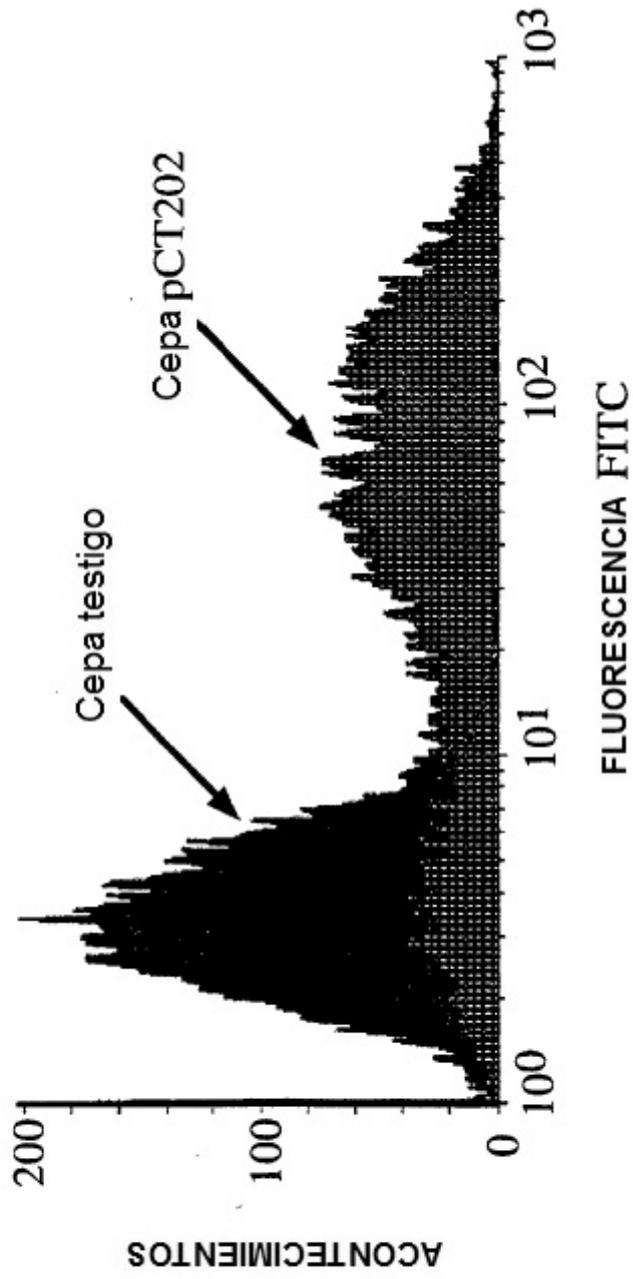


FIG. 5

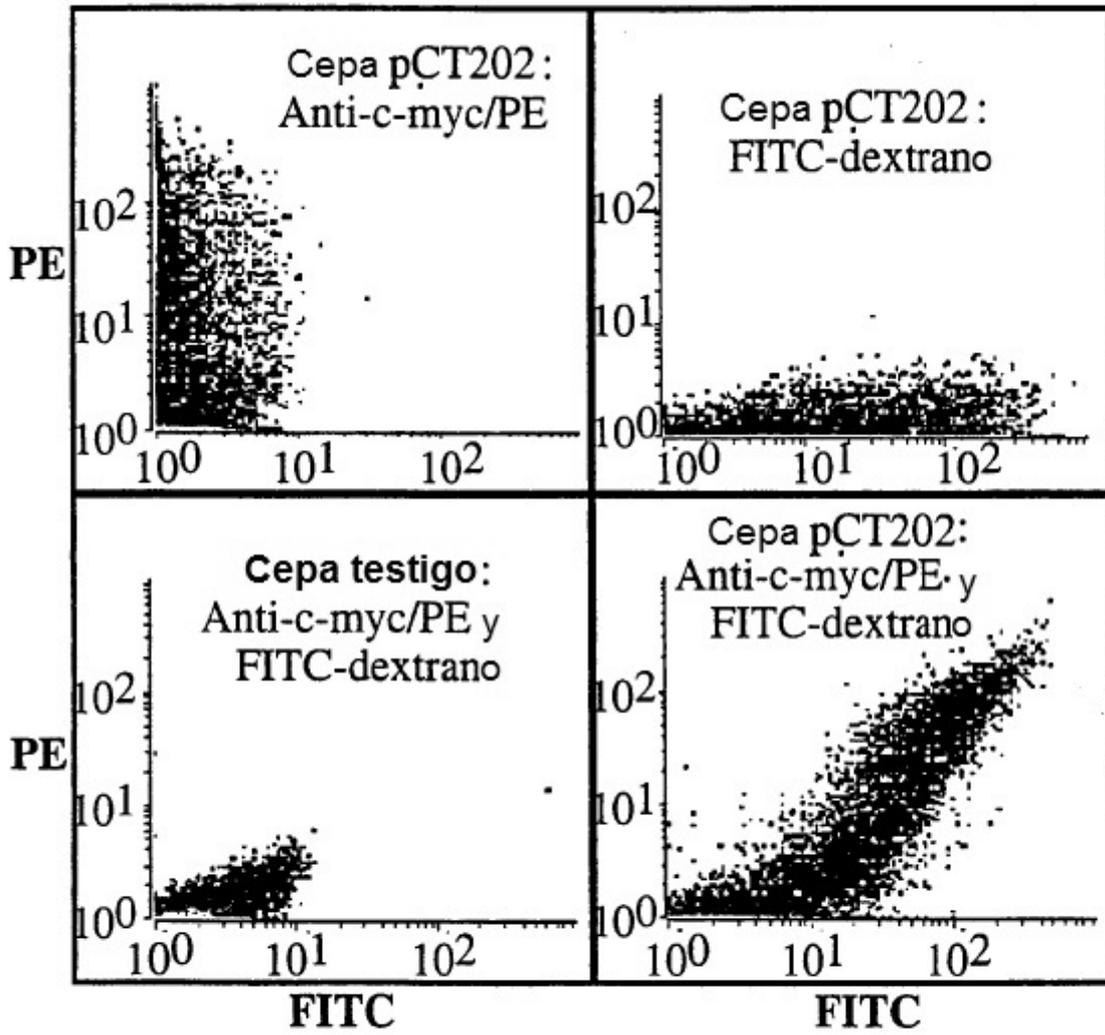


FIG. 6

```

1  ATTAGAATTC CCTACTTCAT ACATTTTCAA TTAAGATGCA GTTACTTCGC
51  TGTTTTTCAA TATTTTCTGT TATTGCTTCA GTTTTAGCAC AGGAACTGAC
101 AACTATATGC GAGCAAATCC CCTCACCAAC TTTAGAATCG ACGCCGTACT
151 CTTTGTCAAC GACTACTATT TTGGCCAACG GGAAGGCAAT GCAAGGAGTT
201 TTTGAATATT ACAAATCAGT AACGTTTGTC AGTAATFGCG GTTCTCACCC
251 CTCAACAAC AGCAAAGGCA GCCCCATAAA CACACAGTAT GTTTTTAAGG
301 ACAATAGCTC GACGATTGAA GGTACATACC CATAACGACGT TCCAGACTAC
351 GCTCTGCAGG CTAGCGACGT CGTTATGACT CAAACACCAC TACTACTTCC
401 TGTTAGTCTA GGAGATCAAG CCTCCATCTC TTGCAGATCT AGTCAGAGCC
451 TTGTACACAG TAATGGAAAC ACCTATTTAC GTTGGTACCT GCAGAAGCCA
501 GGCCAGTCTC CAAAGGTCTT GATCTACAAA GTTTCCAACC GATTTTCTGG
551 GGTCCCAGAC AGGTTTCAGT GCAGTGGATC AGGGACAGAT TTCACACTCA
601 AGATCAGCAG AGTGGAGGCT GAGGATCTGG GAGTTTATTT CTGCTCTCAA
651 AGTACACATG TTCCGTGGAC GTTCGGTGA GGCACCAAGC TTGAAATTA
701 GTCCTCTGCT GATGATGCTA AGAAGGATGC TGCTAAGAAG GATGATGCTA
751 AGAAAGATGA TGCTAAGAAA CATGGTGACG TCAAACCTGA TGAGACTGGA
801 GGAGGCTTGG TGCAACCTGG GAGGCCCATG AACTCTCCT GTGTTGCCTC
851 TGGATPACT TTTAGTGACT ACTGGATGAA CTGGGTCCGC CAGTCTCCAG
901 AGAAAGGACT GGAGTGGGTA GCACAAATTA GAAACAAACC TTATAATTAT
951 GAAACATATT ATTCAGATTC TGTGAAAGGC AGATTCACCA TGTCAGAGA
1001 TGATTCCAAA AGTAGTGTCT ACCTGCAAAT GAACAACTTA AGAGTTGAAG
1051 ACATGGGTAT CTATTACTGT ACGGGTTCTT ACTATGGTAT GGACTACTGG
1101 GGTCAAGGAA CCTCAGTAC CGTCTCTCA GAACAAAAGC TTATTTCTGA
1151 AGAAGACTTG TAATAGCTCG AG

```

FIG. 7

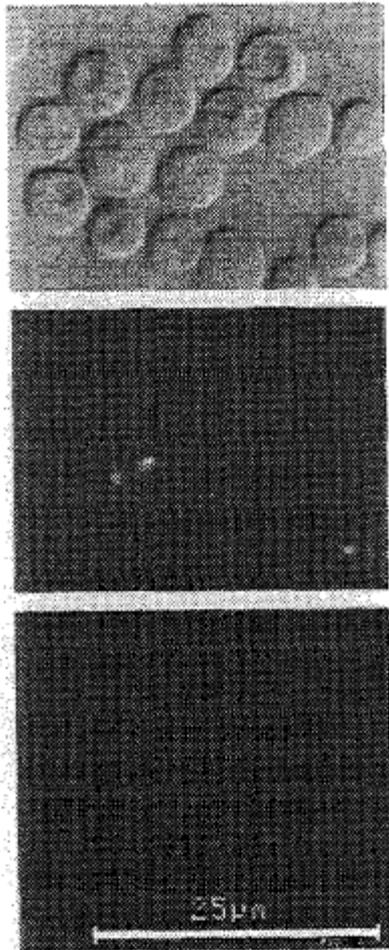


FIG. 8A

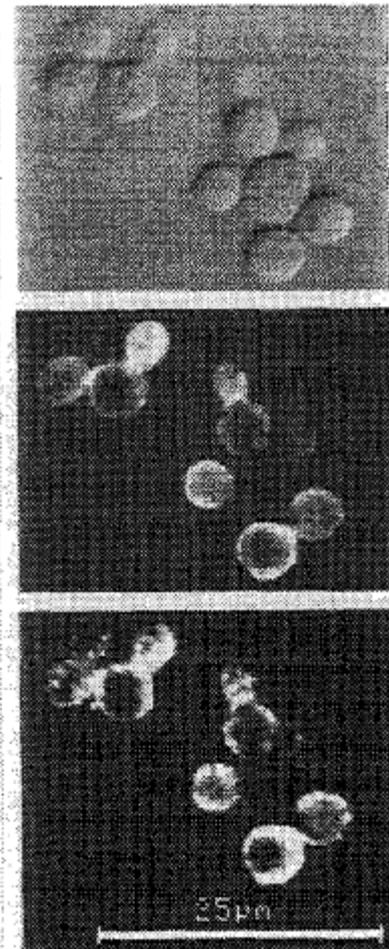


FIG. 8B

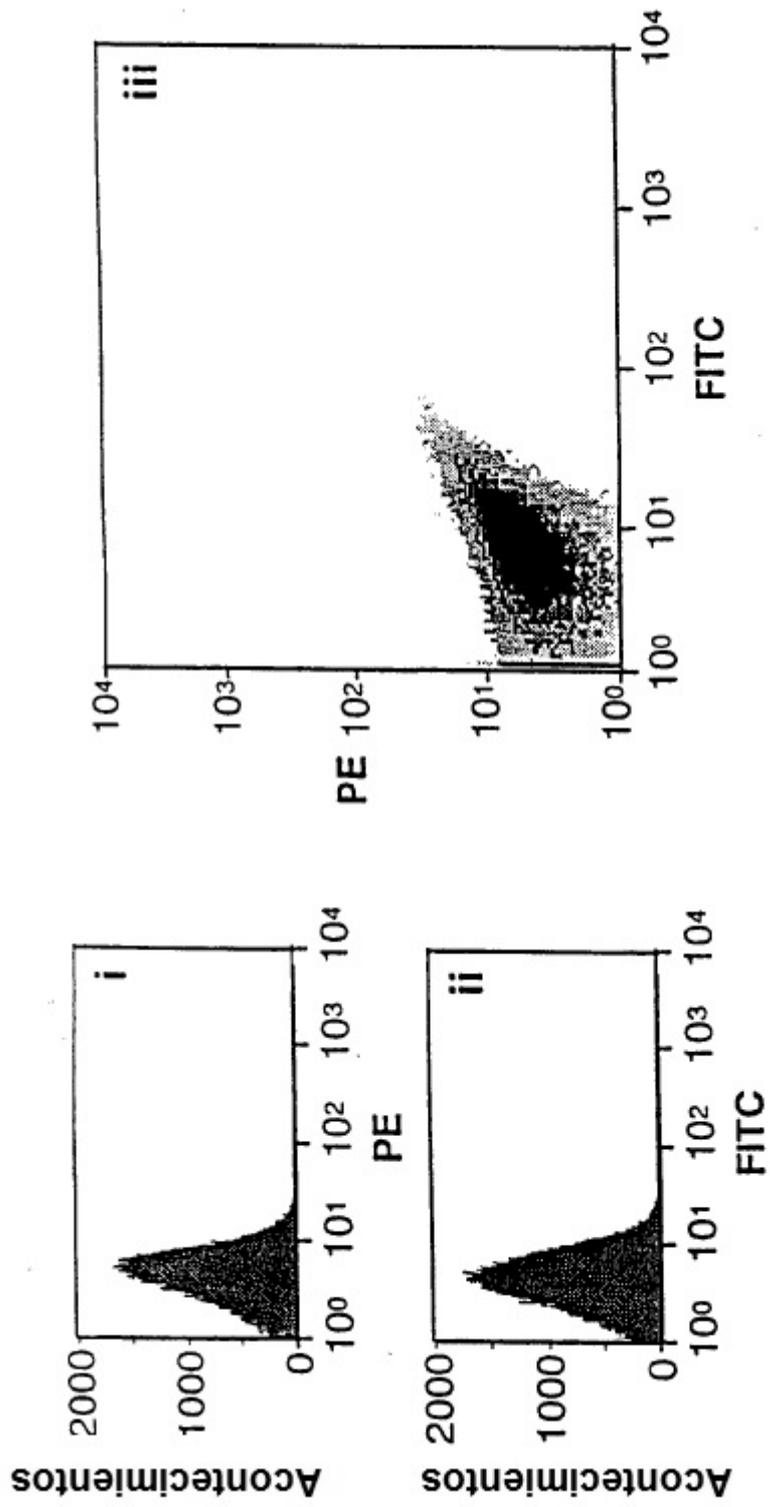


FIG. 9A

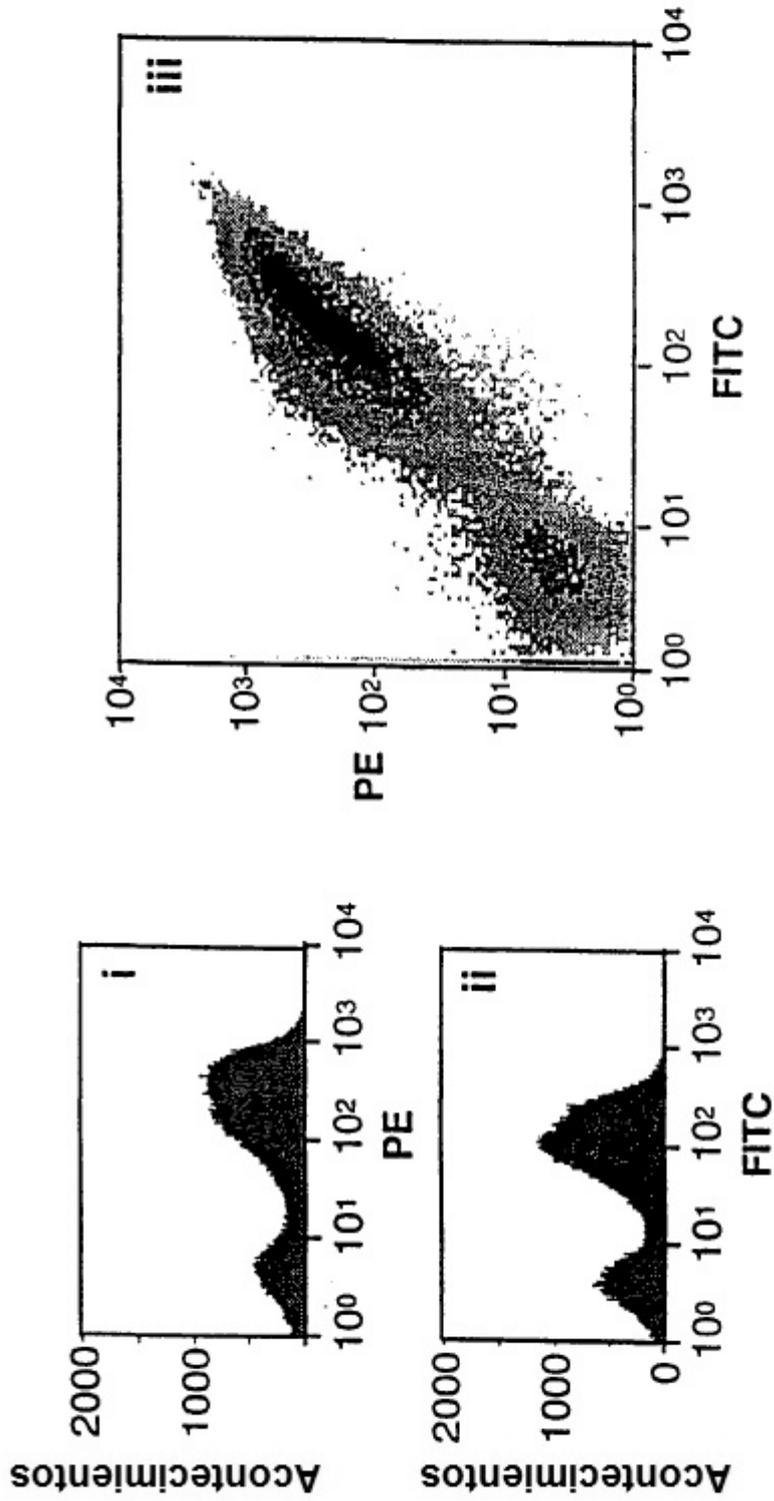


FIG. 9B

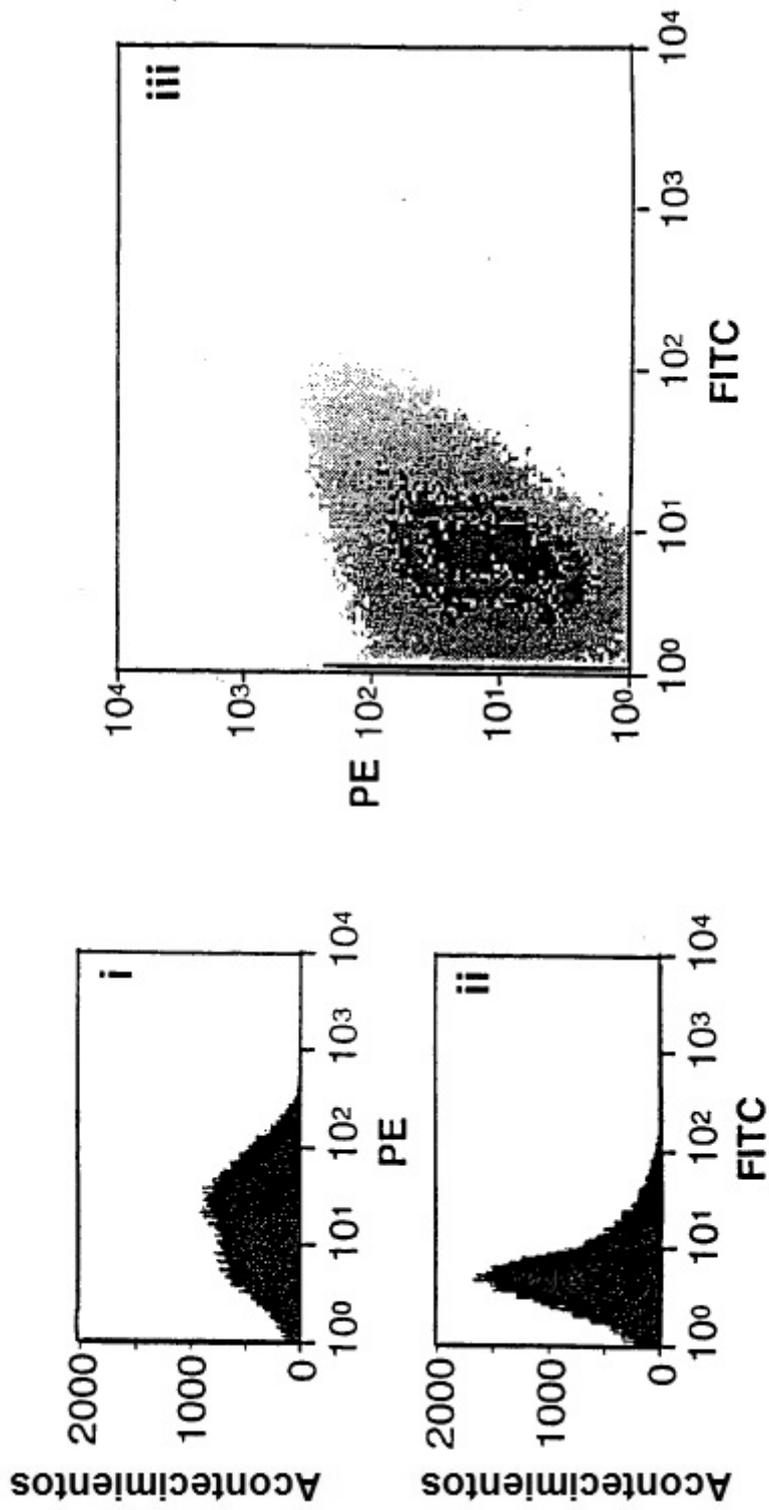


FIG. 9C

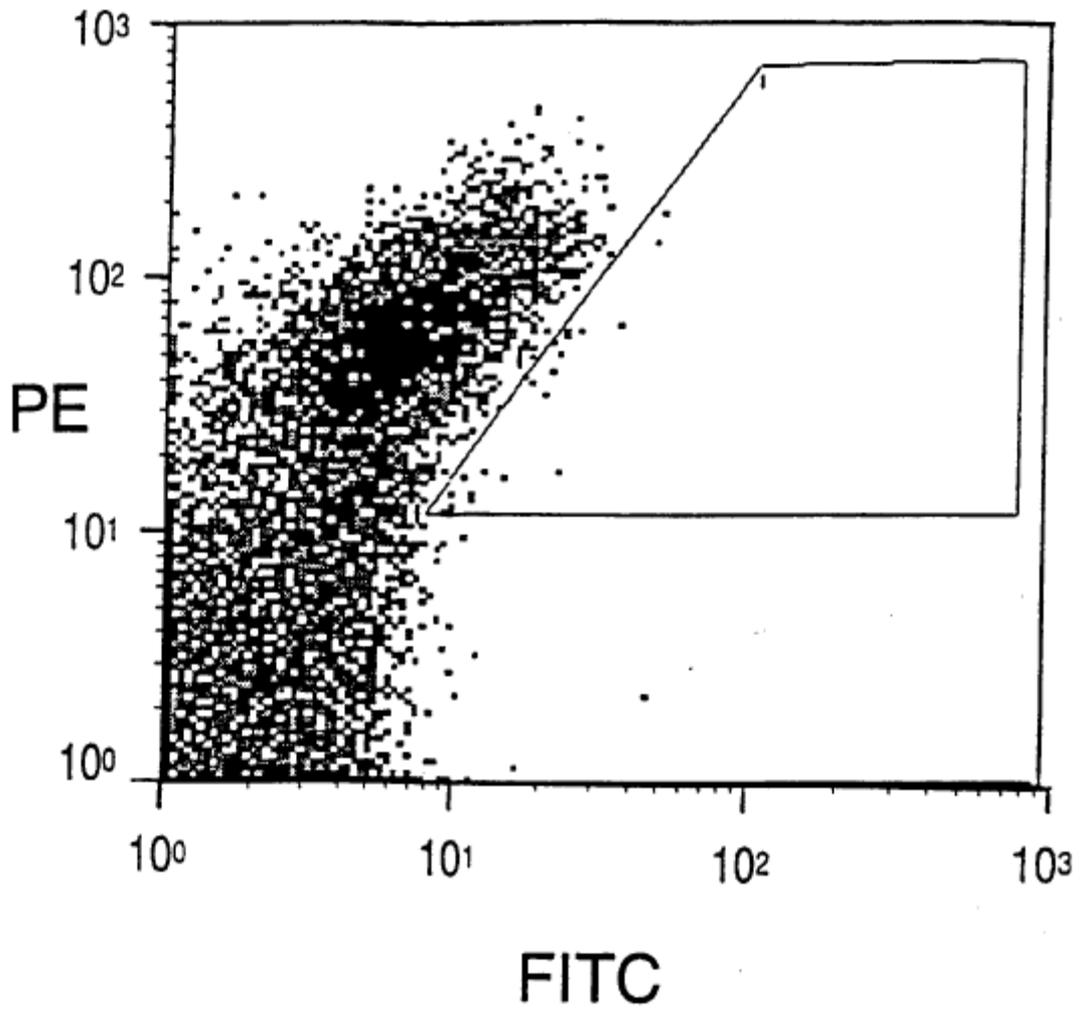


FIG. 10A

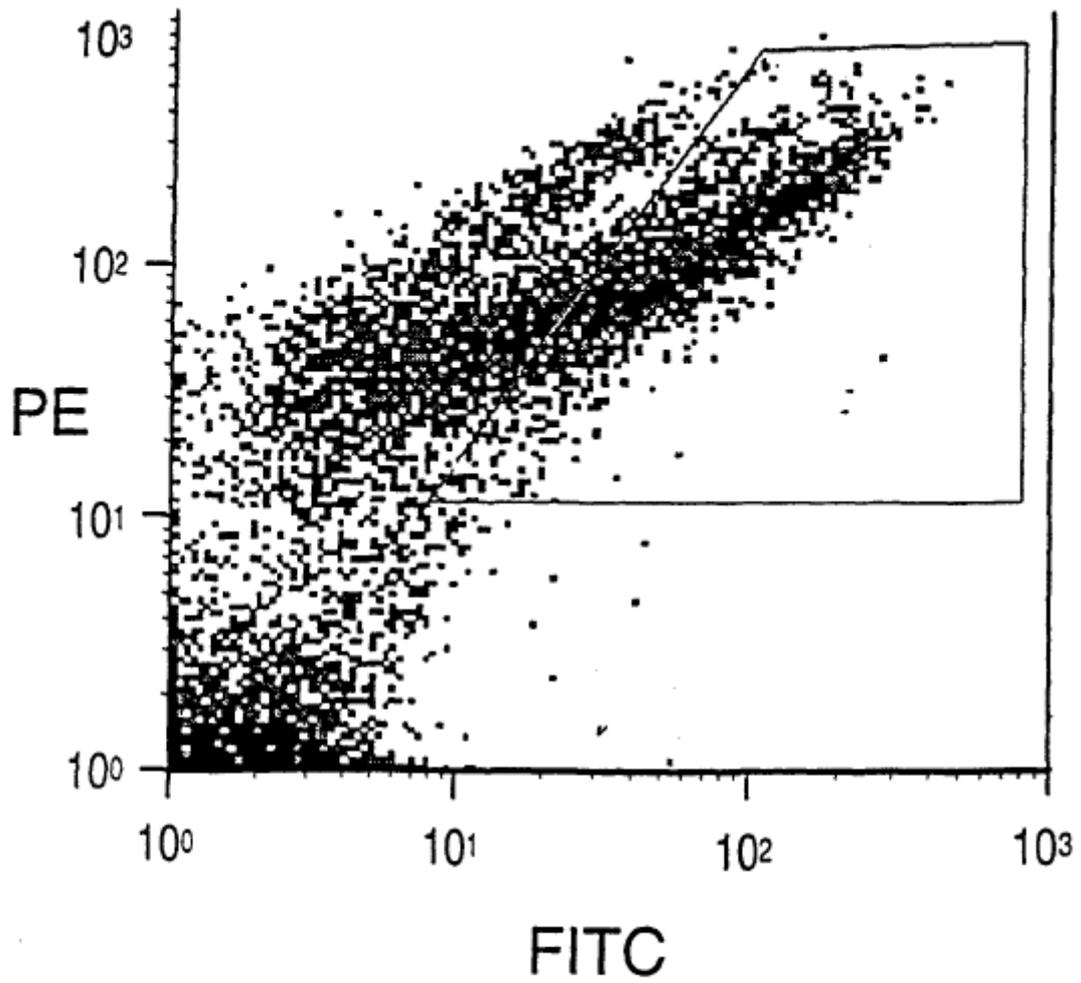


FIG. 10B

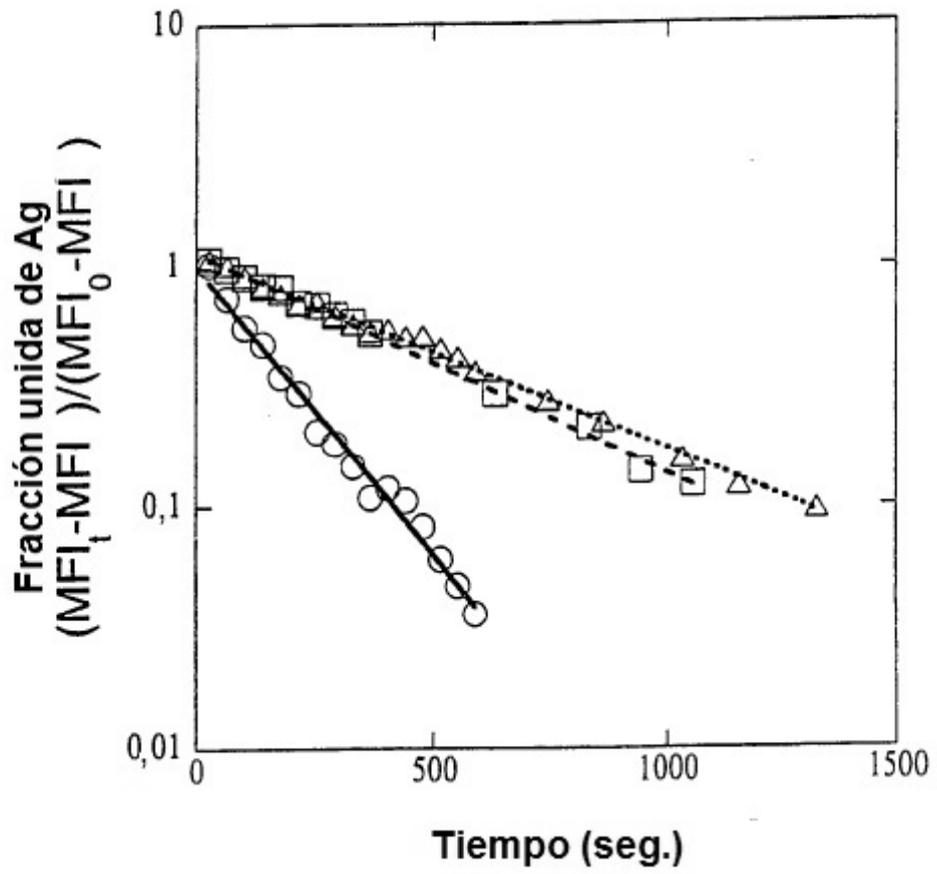


FIG. 11

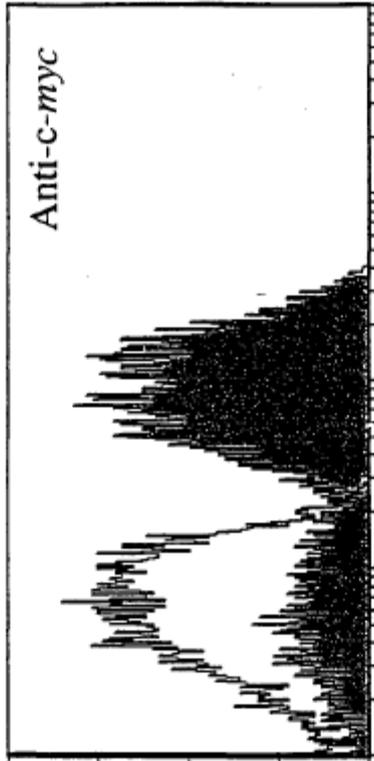


FIG. 12B

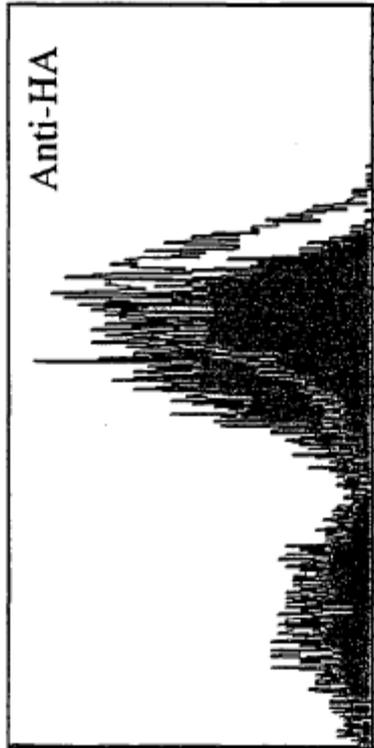


FIG. 12A

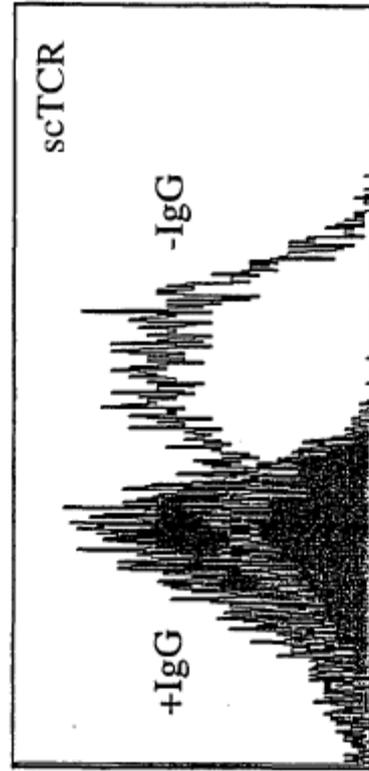


FIG. 12D



FIG. 12C

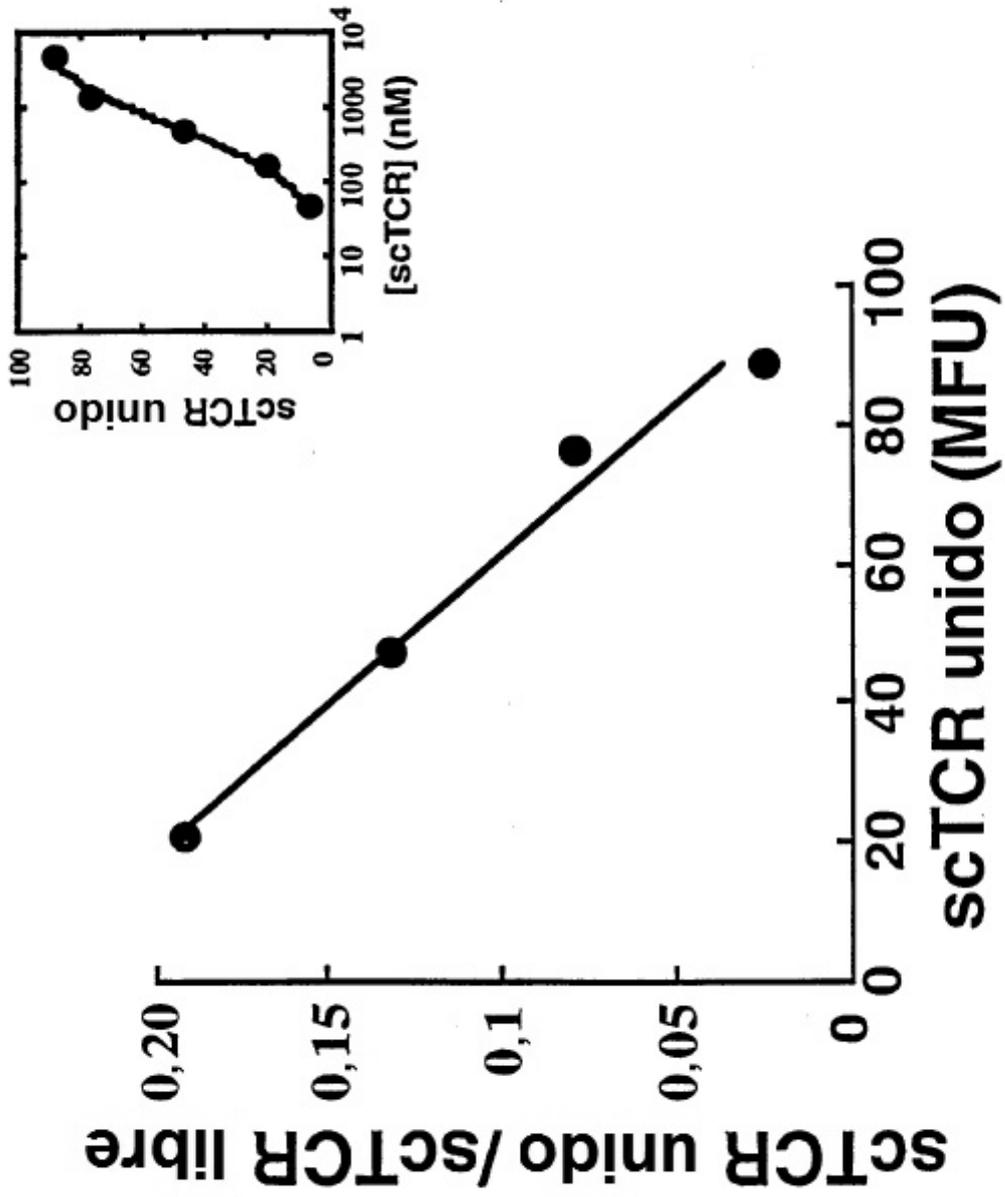


FIG. 13

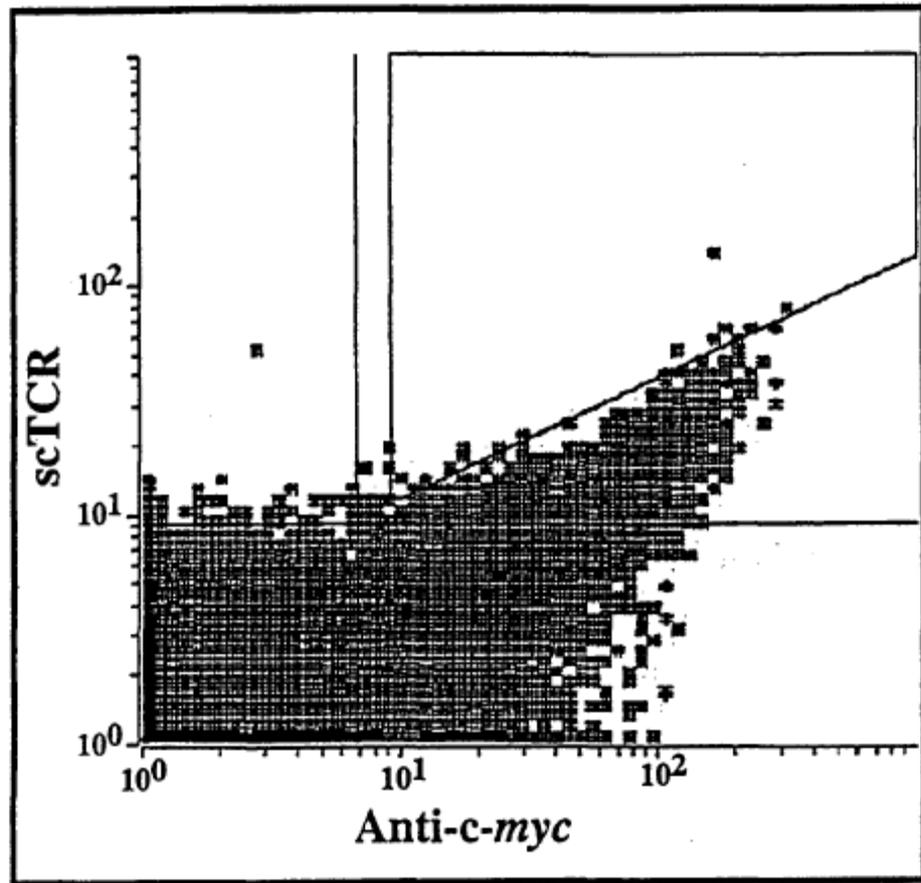


FIG. 14A

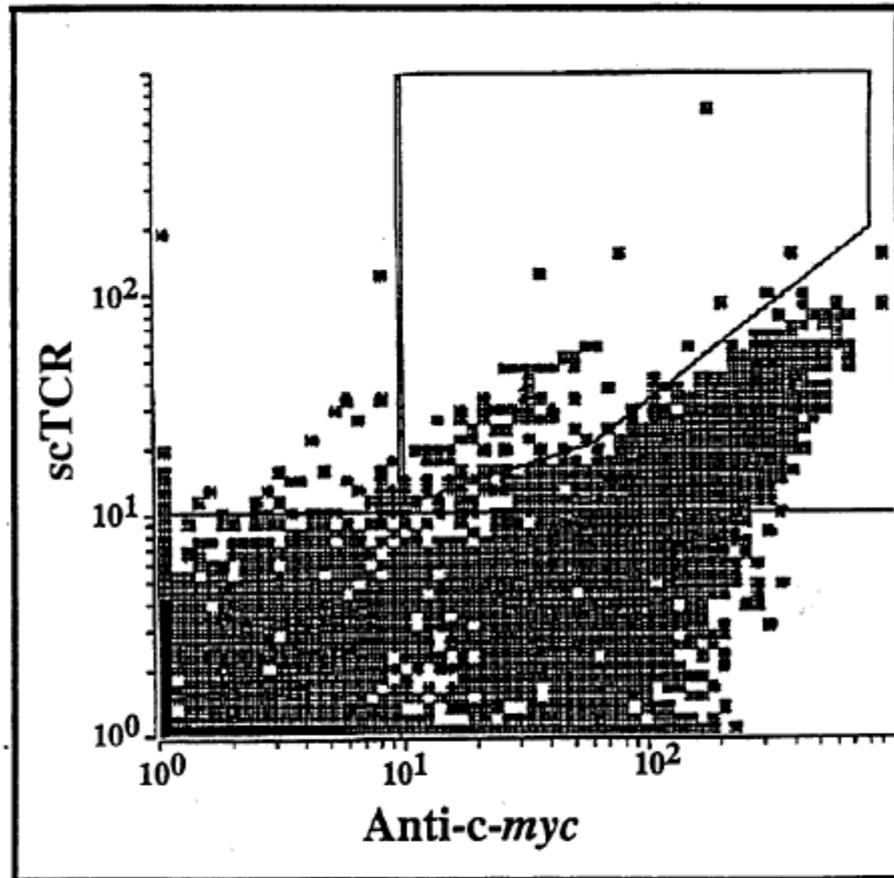


FIG. 14B

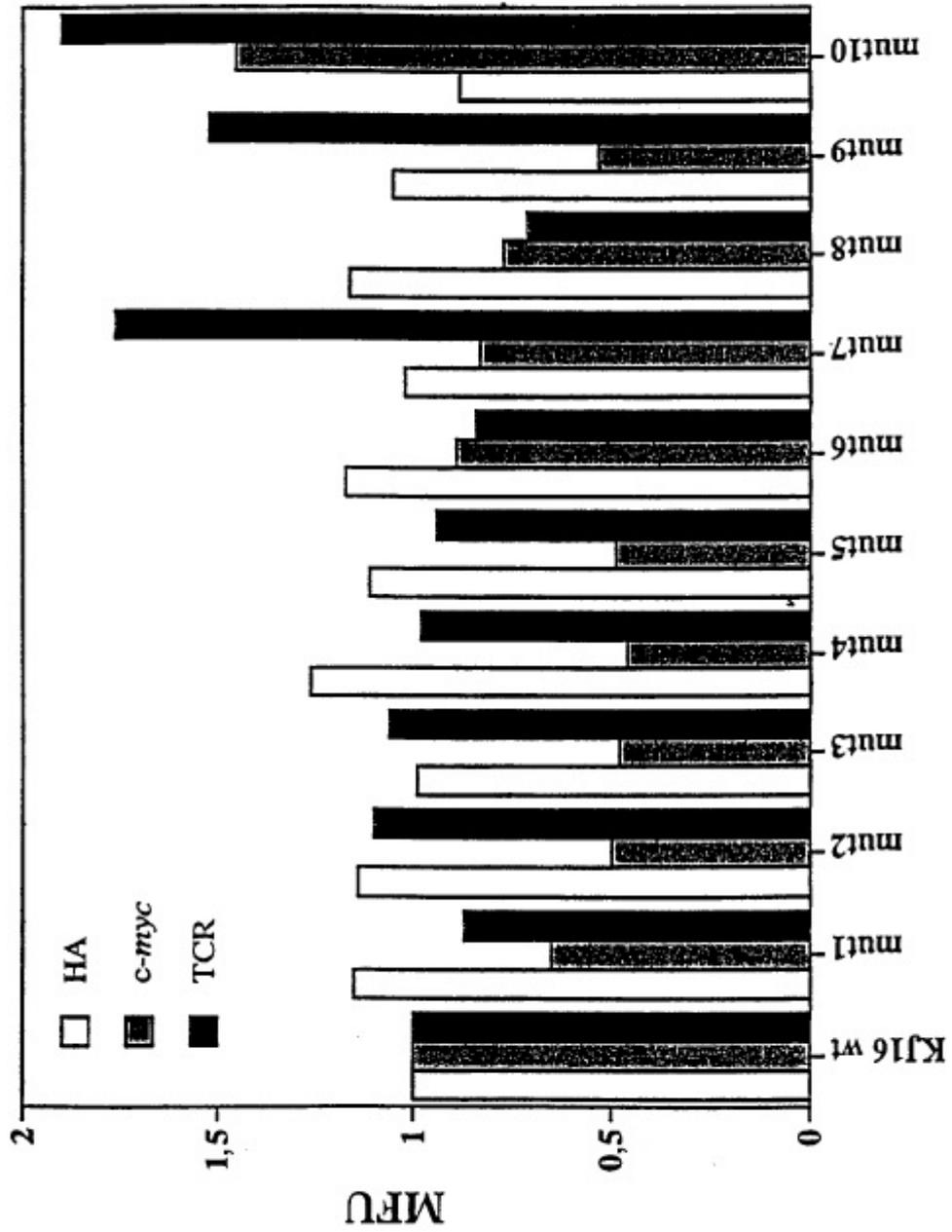
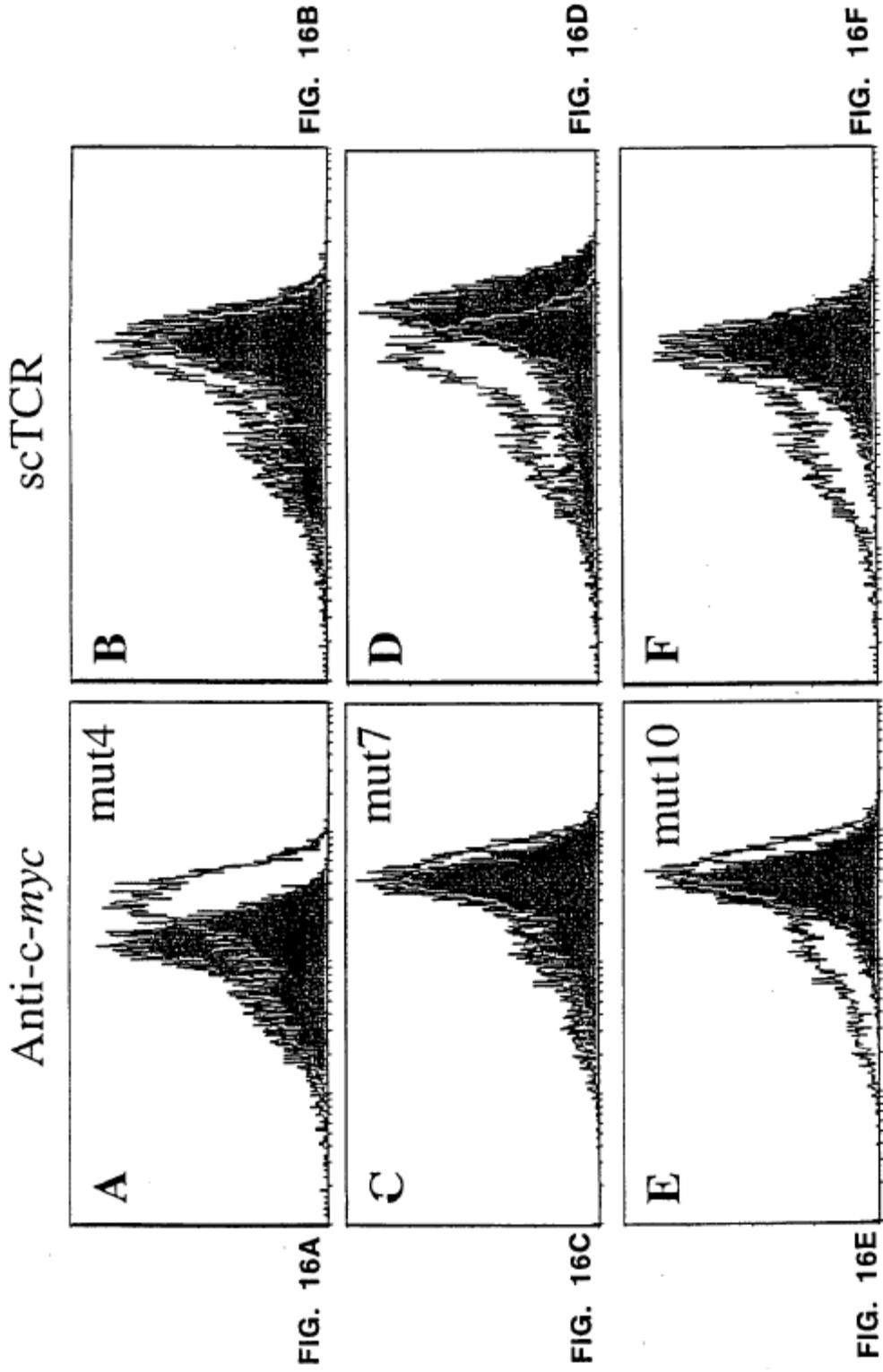


FIG. 15



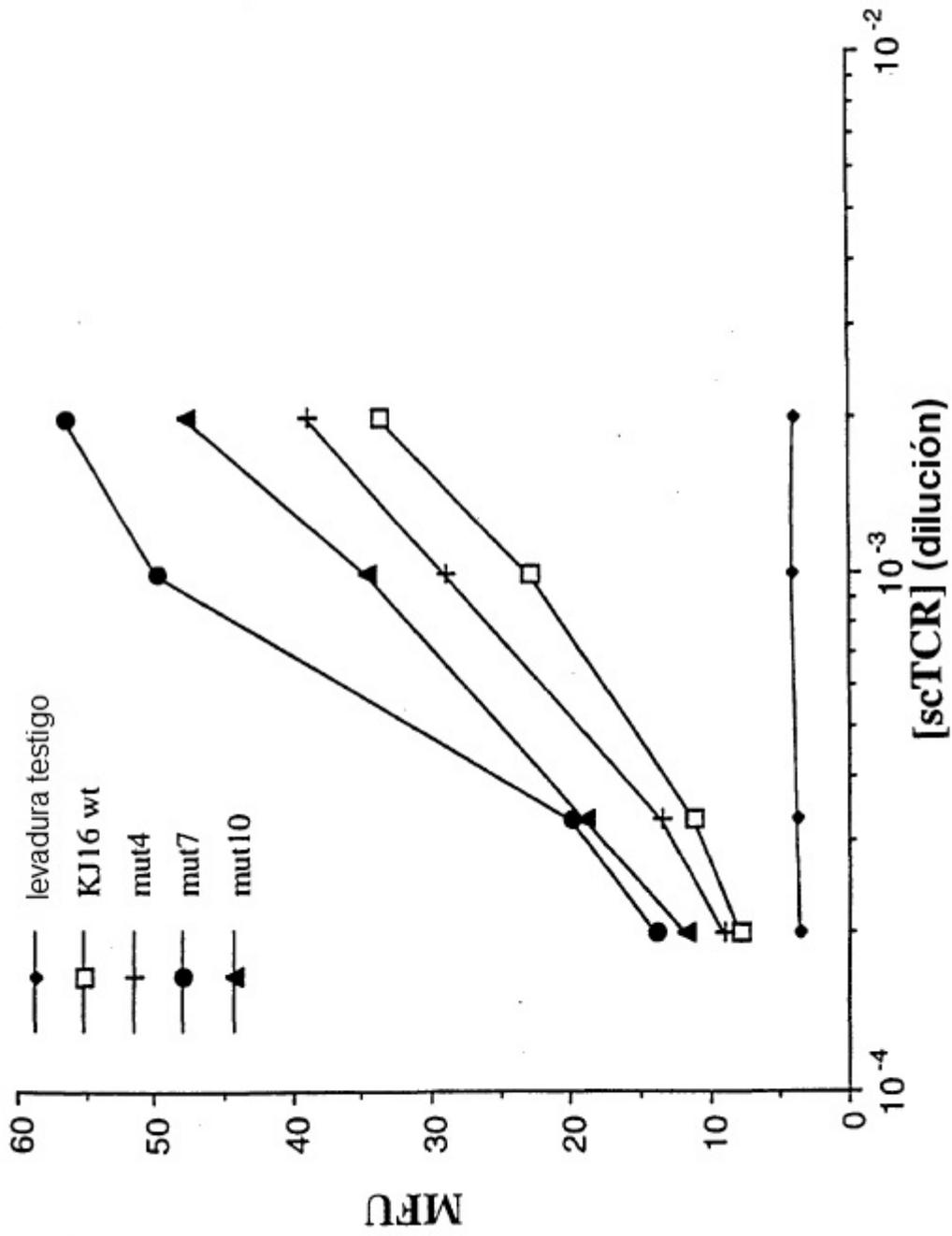


FIG. 17

	V _L	
KJ16 de tipo silvestre	GACGTCC	TGGTGACCCAAACTCCTGCTCCCTGCTGCATCTCCGGATGAATC
KJ16 mut 4	GACGTCC	TGGTGACCCAAACTCCTGCTCCCTGCTGCATCTCCGGATGAATC
KJ16 mut 7	GACGTCC	TGGTGACCCAAACTCCTGCTCCCTGCTGCATCTCCGGATGAATC
-----CDR1-----		
KJ16 de tipo silvestre	TGTCACC	CATCACATGCCAGGCAAGCCAGGACATTTGGTACTTGTAGTTTGGT
KJ16 mut 4	TGTCACC	CATCACATGCCAGGCAAGCCAGGACATTTGGTACTTGTAGTTTGGT
KJ16 mut 7	TGTCACC	CATCACATGCCAGGCAAGCCAGGACATTTGGTACTTGTAGTTTGGT
		↑ S26R
-----CDR2-----		
KJ16 de tipo silvestre	ATCAGCA	GAACCCAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAACTATC
KJ16 mut 4	ATCAGCA	GAACCCAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAACTATC
KJ16 mut 7	ATCAGCA	GAACCCAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAACTATC

KJ16 de tipo silvestre	TTGGCAG	ATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTAGATCTGGCACACAGTA
KJ16 mut 4	TTGGCAG	ATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTAGATCTGGCACACAGTA
KJ16 mut 7	TTGGCAG	ATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTAGAATCTGGCACACACAGTA
		↑ R66K

FIG. 18-1

KJ16 de tipo silvestre	TTC	TCT	TAA	GAT	CA	A	C	A	G	A	C	T	A	C	A	G	A	G	A	T	A	T	T	G	A	A	C	C	T	A	T	T	A	C	T	G	T	C
KJ16 mut 4	TTC	TCT	TAA	GAT	CA	A	C	A	G	A	C	T	A	C	A	G	A	G	A	T	A	T	T	G	A	A	C	C	T	A	T	T	A	C	T	G	T	C
KJ16 mut 7	TTC	TCT	TAA	GAT	CA	A	C	A	G	A	C	T	A	C	A	G	A	G	A	T	A	T	T	G	A	A	C	C	T	A	T	T	A	C	T	G	T	C

	-----CDR3-----																																						
KJ16 de tipo silvestre	TAC	AGG	T	T	C	T	A	G	T	T	C	C	G	T	A	C	A	C	G	T	T	T	G	A	G	C	T	G	G	C	A	C	C	A	A	G	C	T	C
KJ16 mut 4	TAC	AGG	T	T	C	T	A	G	T	T	C	C	G	T	A	C	A	C	G	T	T	T	G	A	G	C	T	G	G	C	A	C	C	A	A	G	C	T	C
KJ16 mut 7	TAC	AGG	T	T	C	T	A	G	T	T	C	C	G	T	A	C	A	C	G	T	T	T	G	A	G	C	T	G	G	C	A	C	C	A	A	G	C	T	C

	V _H	-----C-myc-----																																													
KJ16 de tipo silvestre	AA	AC	G	G	.	.	.	T	C	C	T	C	A	G	A	C	A	A	A	A	G	C	T	T	A	T	T	T	C	C	G	A	A	G	A	G	A	T	T	T	G	T	A	G	T	A	A
KJ16 mut 4	AA	AC	G	G	.	.	.	T	C	C	T	C	A	G	A	C	A	A	A	A	G	C	T	T	A	T	T	T	C	C	G	A	A	G	A	G	A	T	T	T	G	T	A	G	T	A	A
KJ16 mut 7	AA	AC	G	G	.	.	.	T	C	C	T	C	A	G	A	C	A	A	A	A	G	C	T	T	A	T	T	T	C	C	G	A	A	G	A	G	A	T	T	T	G	T	A	G	T	A	A

		↑	K258E
--	--	---	-------

FIG. 18-2

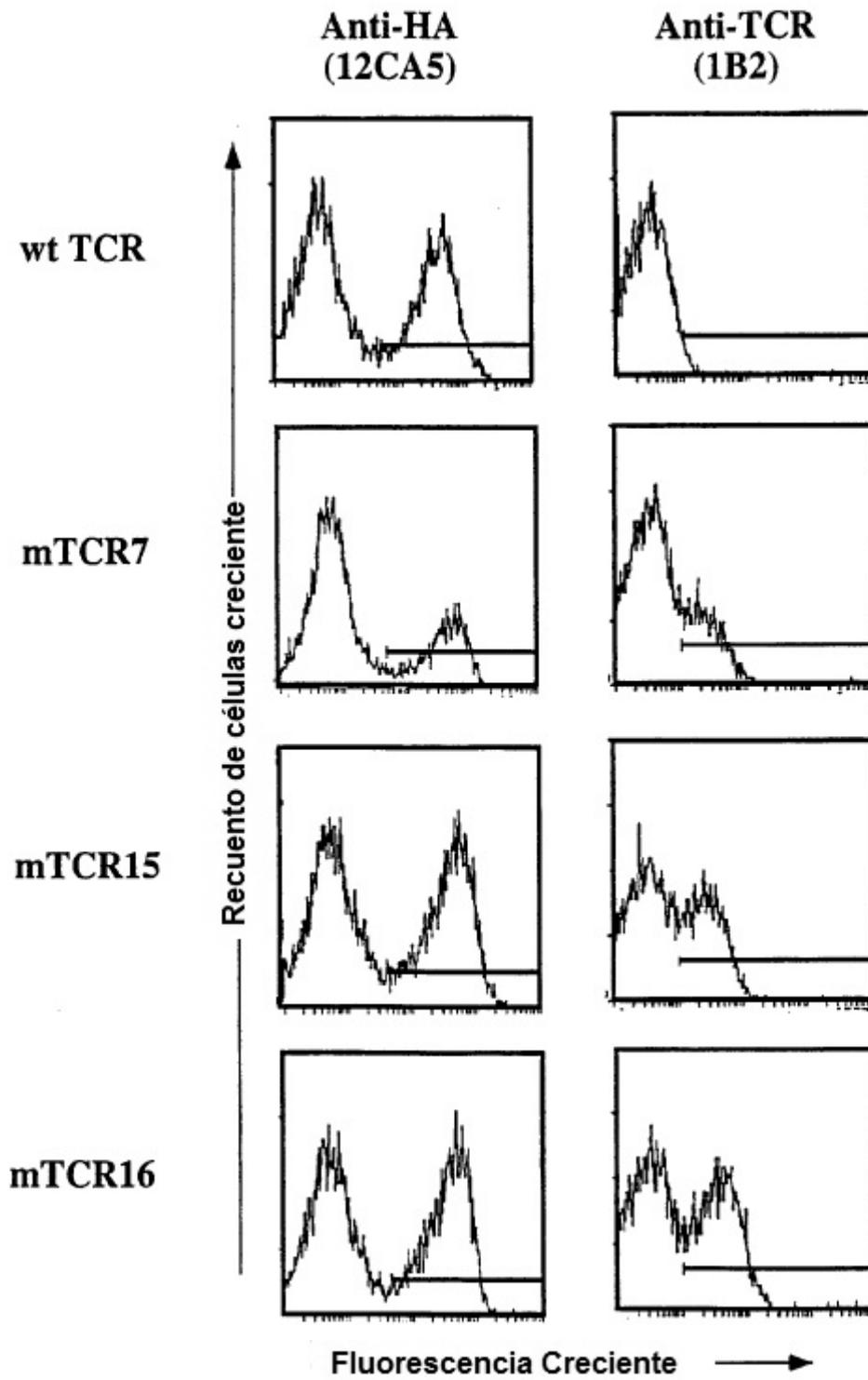


FIG. 19

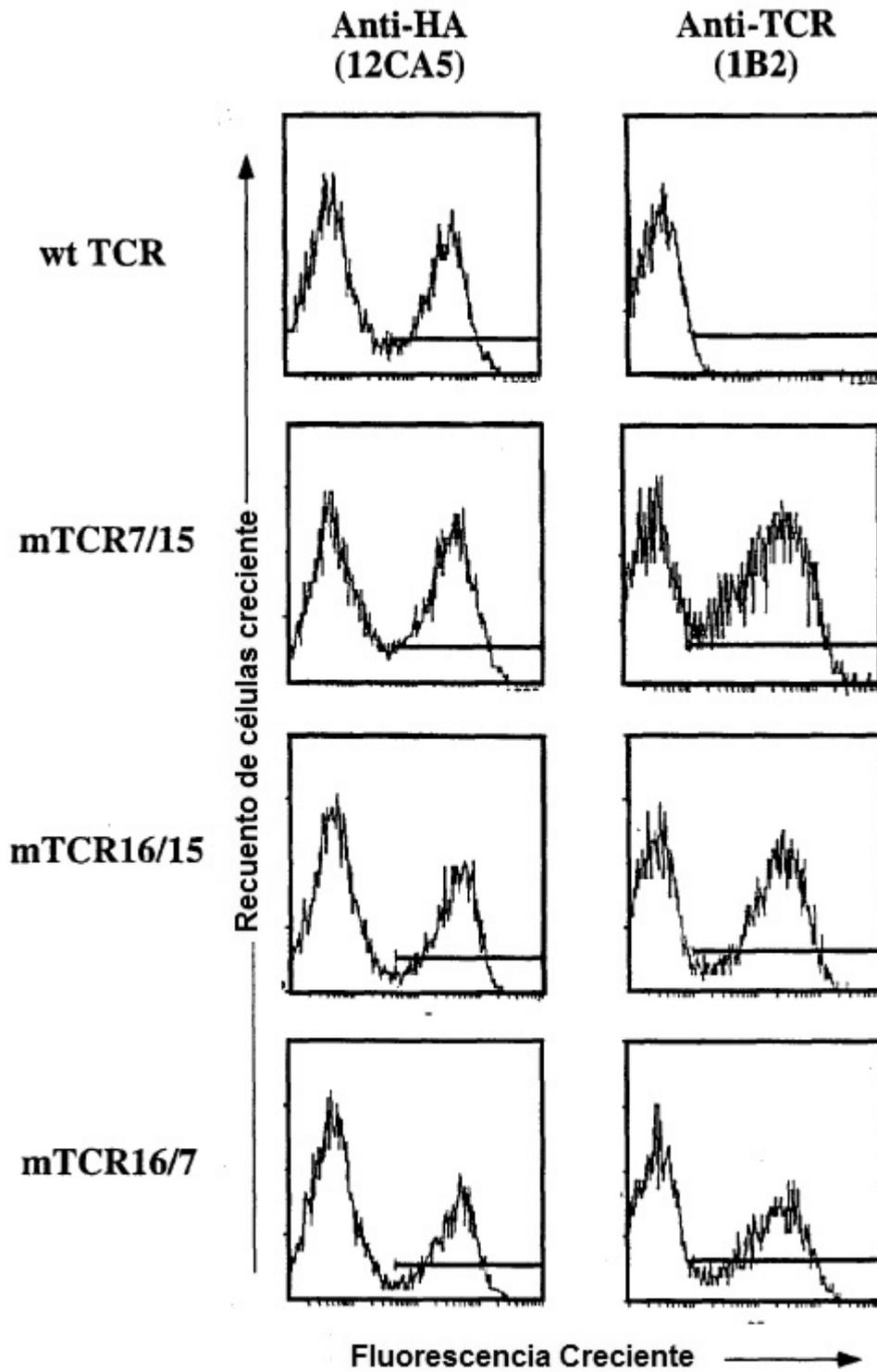


FIG. 20


```

-----cdr1-----
TACTCTGCGA CACCTTATCT GTTCIGGTAT GTCCAGTACC CGCGGCAGGG GCTGCAGCTG
Leu43ΔPro
-----cdr2-----
CTCCTCAAGT ACTATTCCGG AGACCCAGTG GTTCAAGGAG TGAATGGCTT TGAGGCTGAG
-----hv4-----
TTCAGCAAGA GCAACTCTTC CTTCCACCTG CGGAAAGCCT CCGTGCACCTG GAGCGACTCG
-----cdr3-----
GCTGTGTACT TCTGTGCTGT GAGCGGCTTT GCAAGTGCGC TGACATTTGG ATCTGGCACA
Leu104ΔPro
AAAGTCATTG TTCTACCATA CATCTAG + 6-His

```

FIG. 21-2

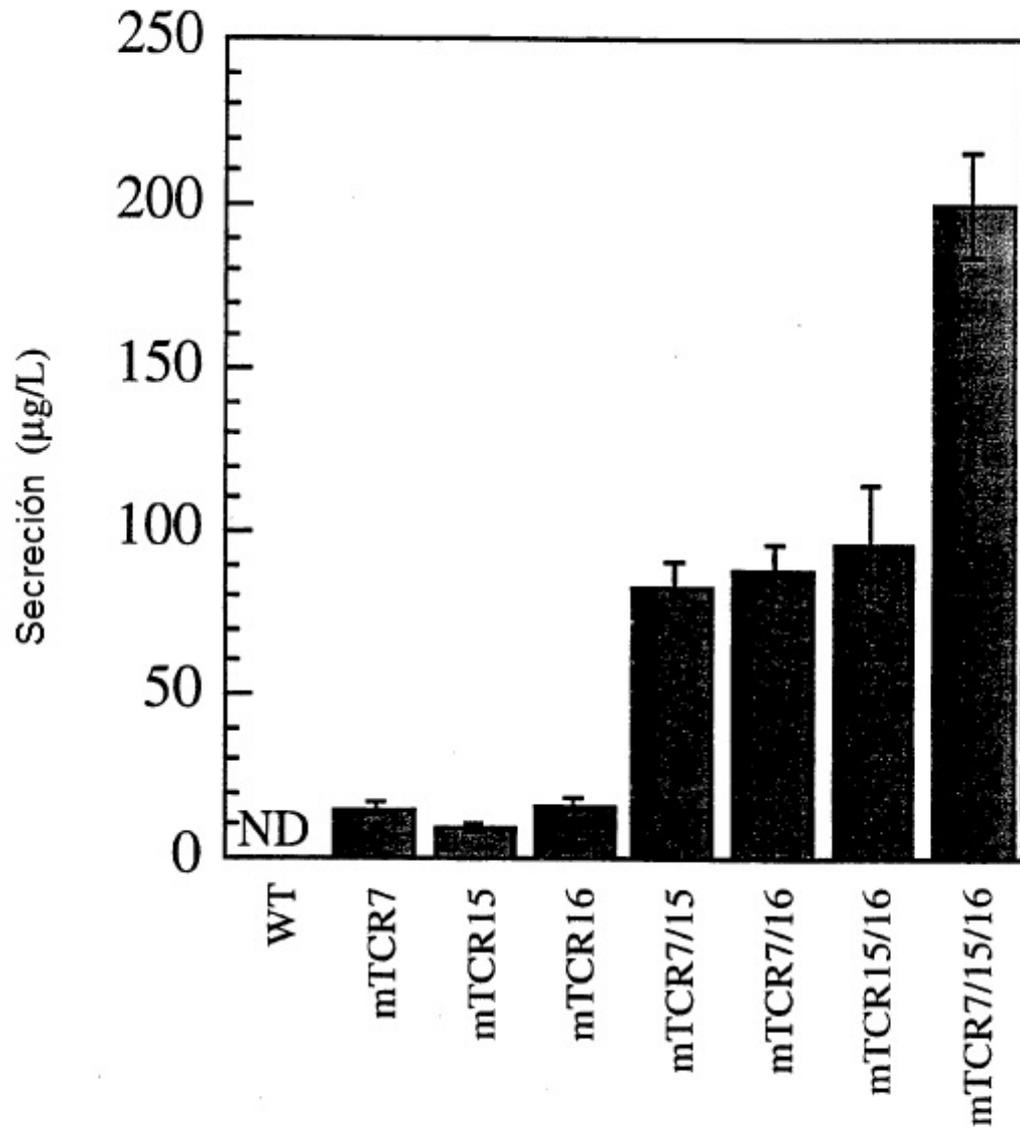


FIG. 22

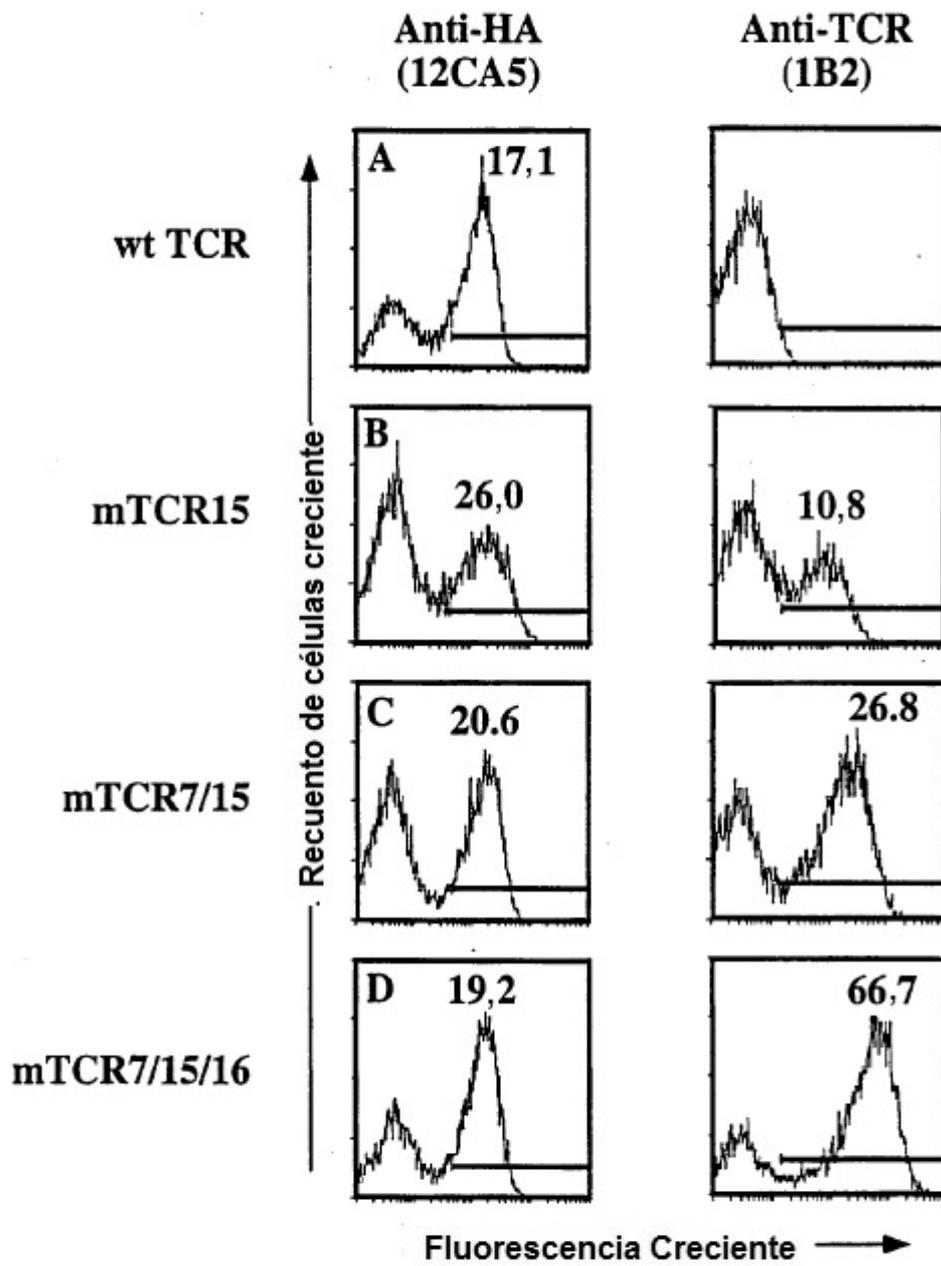


FIG. 23A

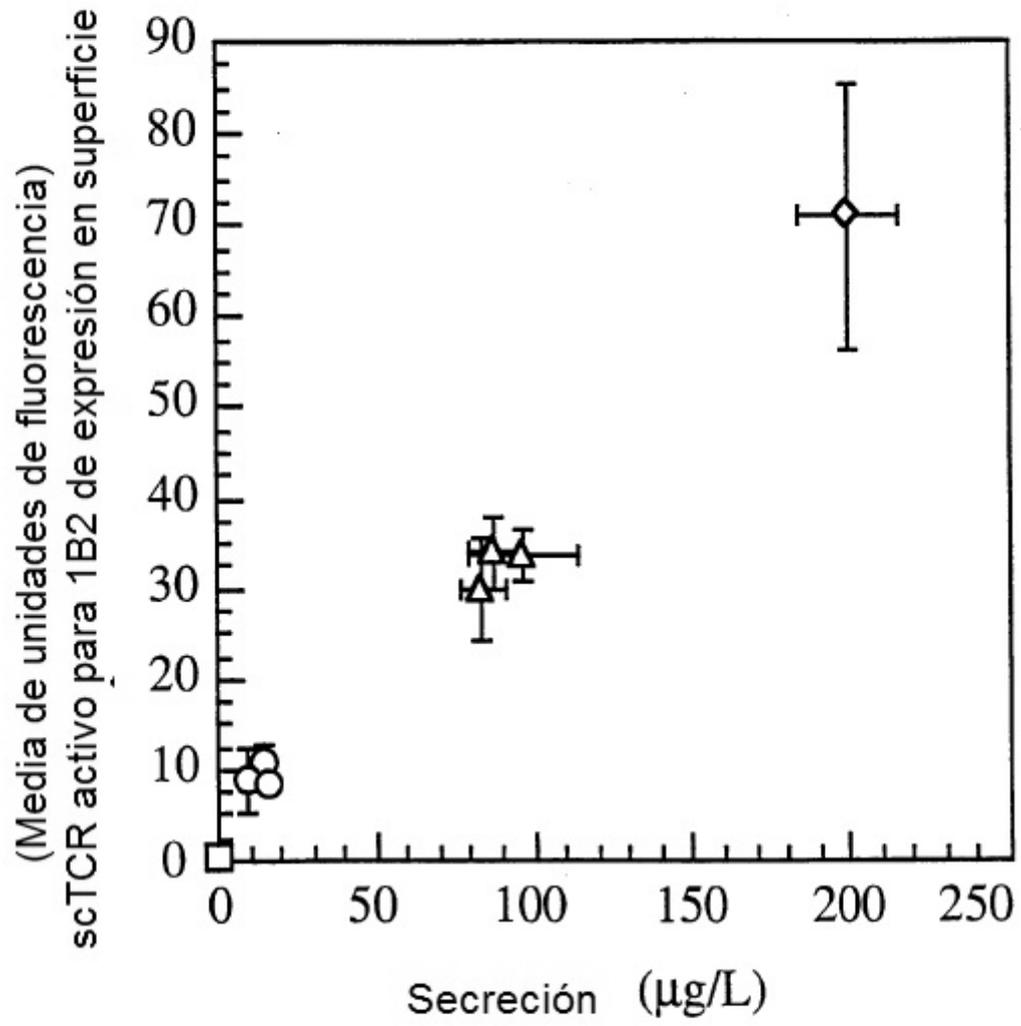


FIG. 23B

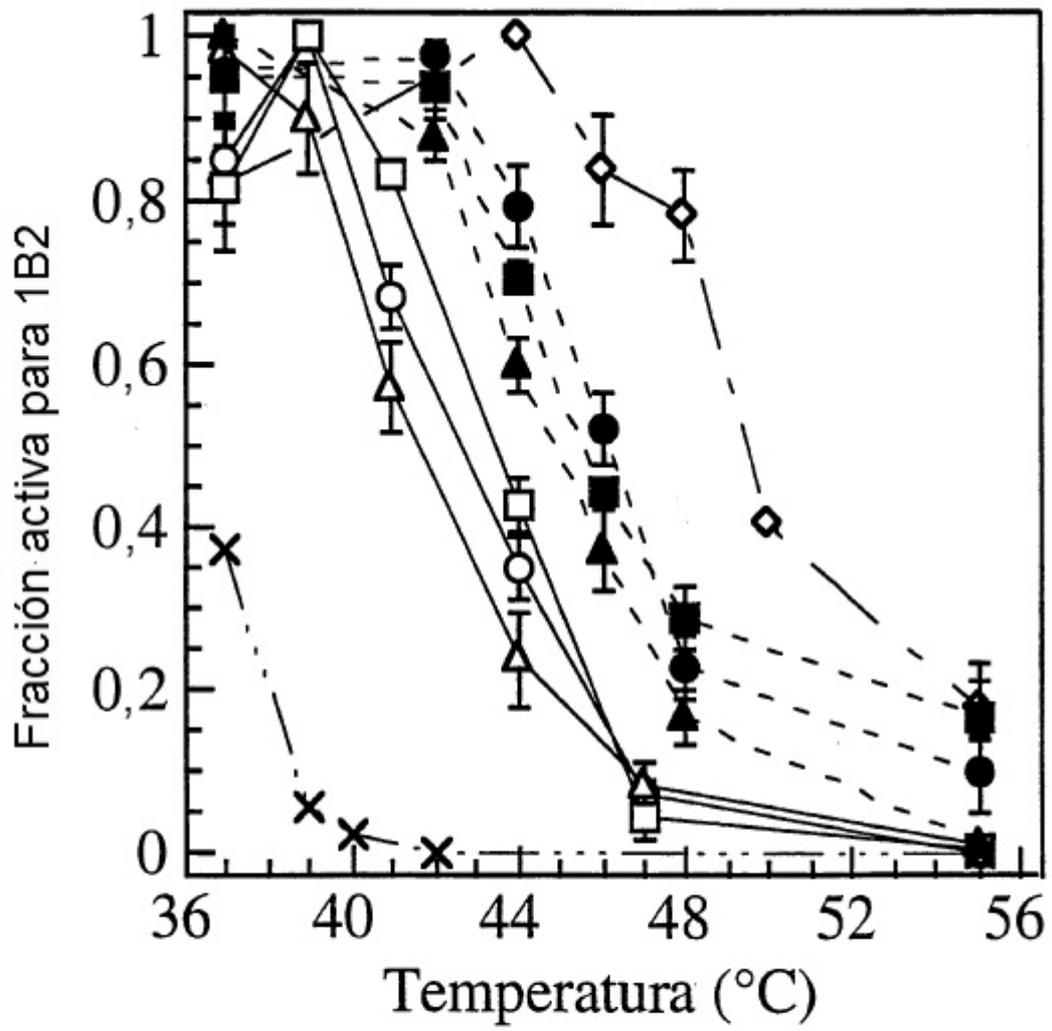


FIG. 24A

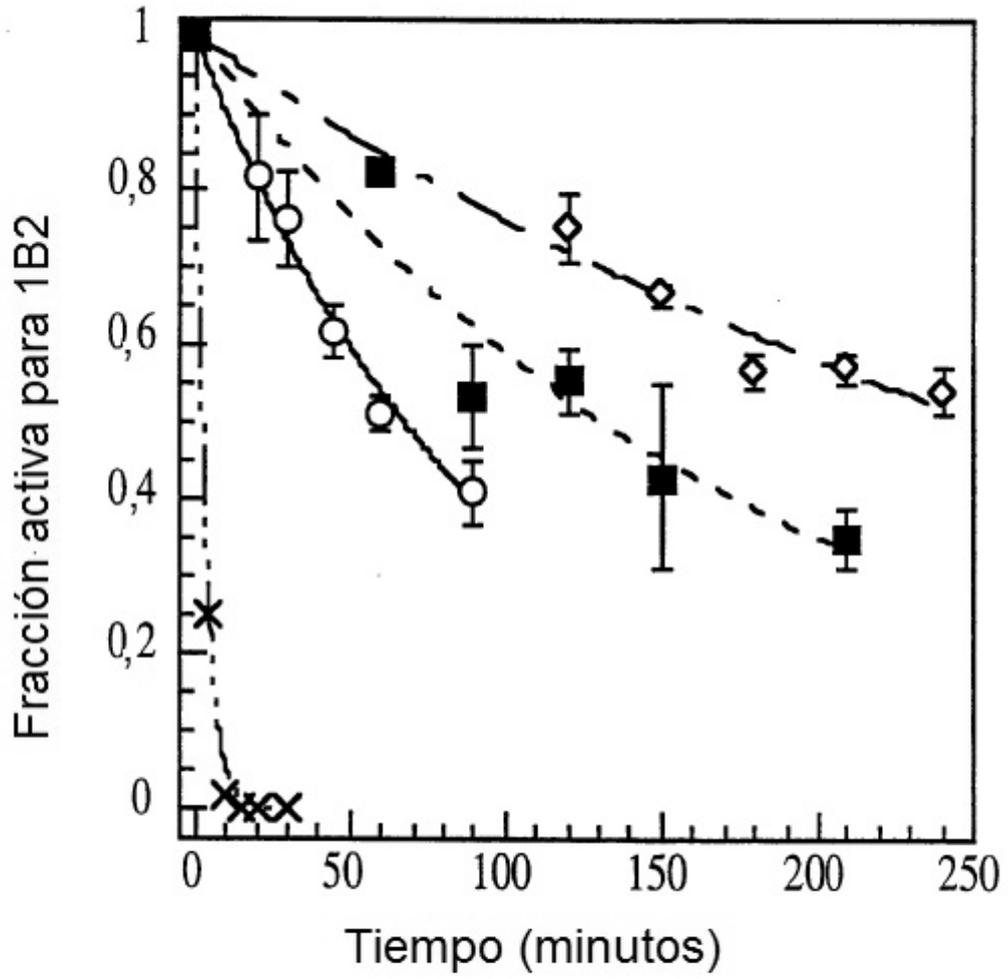


FIG. 24B

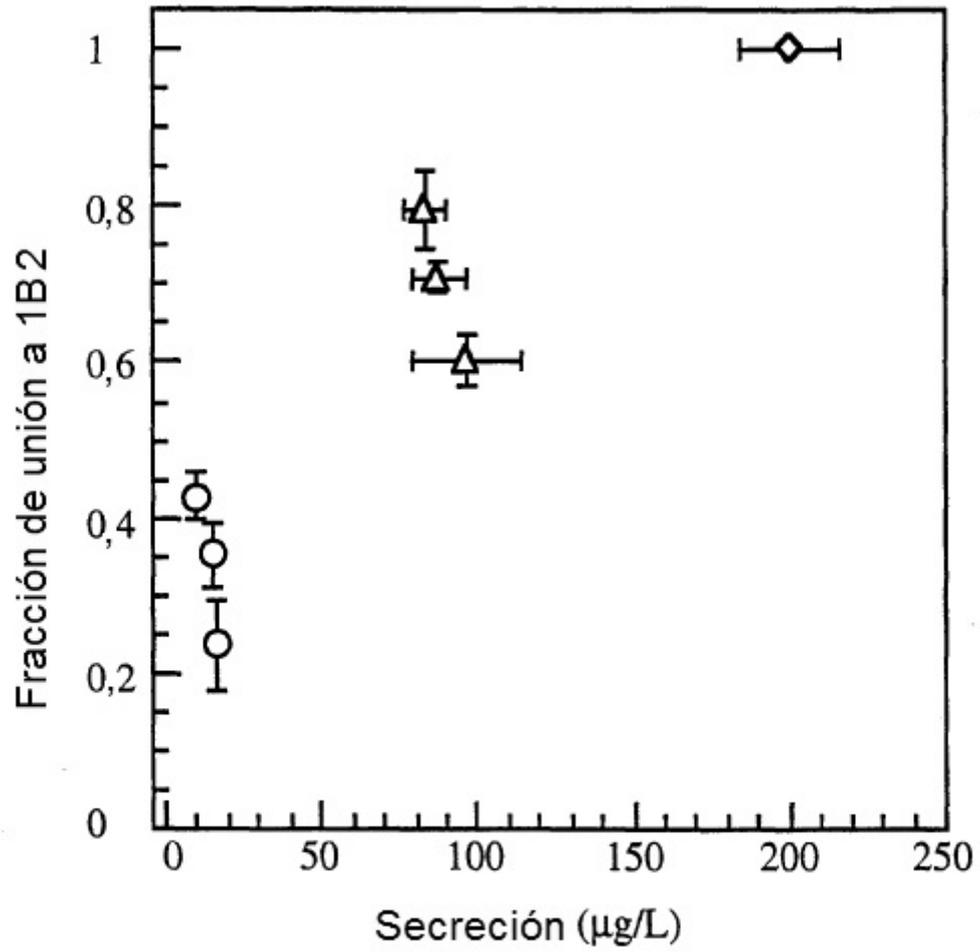


FIG. 25