

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 194**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C40B 50/06 (2006.01)

C40B 40/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2009 E 09719237 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2257638**

54 Título: **Métodos para transformar levaduras**

30 Prioridad:

03.03.2008 US 67910 P

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

11.03.2015

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**HSIEH, CHUNG-MING;
BELK, JONATHAN, P.;
PEREZ, JENNIFER, M. y
BENATUIL, LORENZO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 531 194 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para transformar levaduras

5 **Solicitud relacionada**

Esta solicitud reclama prioridad y beneficio con respecto a la solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/067.910 presentada el 03 de marzo de 2008.

10 **Campo de la invención**

La invención se refiere a los campos de la transformación de levaduras y células de levaduras y bibliotecas de células de levaduras transformadas de este modo y a la producción de productos recombinantes de las mismas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la transformación de levaduras mediante electroporación.

15

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos terapéuticos generados usando inmunizaciones animales *in vivo* o mediante tecnología de expresión de anticuerpos recombinantes *in vitro* han tenido éxito en la clínica y como tales se han validado estas tecnologías como técnicas eficaces de descubrimiento de fármacos. Aunque normalmente se espera que los anticuerpos monoclonales derivados de inmunizaciones animales tengan una afinidad suficientemente alta como alcanzar una eficacia terapéutica, el desarrollo de anticuerpos terapéuticos de inmunizaciones animales requiere la humanización de los anticuerpos no humanos o el acceso a animales transgénicos que expresan anticuerpos humanos. La selección directa de anticuerpos completamente humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos preestablecidas mediante tecnologías de expresión *in vitro* (expresiones en fagos, bacterias, levaduras, células de mamífero y ribosomas) (Chao, G. et al. (2006) Nat. Protoc. 1:755-68; Gai, S. A. y Wittrup, K. D. (2007) Curr. Opin. Struct. Biol. 17:467-73; Griffiths, A. D. et al. (1994) EMBO J. 13:3245-60; He, M. y Khan, F. (2005) Expert Rev. Proteomics 2:421-30; Hoogenboom, H. R. (2002) Methods Mol. Biol. 178:1-37; Hoogenboom, H. R. (2005) Nat. Biotechnol. 23:1105-16) ofrece un valioso abordaje paralelo y puede presentar la mejor alternativa en los casos en los que el antígeno diana no logra producir una respuesta inmunitaria productiva *in vivo*.

Las bibliotecas de anticuerpos humanos se han modificado para que expresen anticuerpos de longitud completa o varios fragmentos de anticuerpos tales como Fab, scFv y dAb. Generalmente, las bibliotecas se construyen capturando y transfiriendo diversidades de anticuerpos de repertorios de linfocitos B en la biblioteca con o sin la introducción adicional de diversidad sintética (Hoet, R. M. et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:344-8), o aleatorizando sintéticamente residuos de CDR en armazones de anticuerpos humanos limitados (Rothe, C. et al. (2008) J. Mol. Biol. 376:1182-200). Dado que las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos se amplifican por separado y se reformatean en el formato de expresión de la biblioteca, se forman nuevos apareamientos entre VH y VL durante este proceso. Aunque este barajado de VH-VL permite la creación de nuevos sitios de antígeno, también aumenta muy significativamente la diversidad de la biblioteca teórica. Se han desarrollado varias estrategias para modificar mejor y hacer más productivas las bibliotecas de anticuerpos reduciendo la diversidad de la biblioteca teórica y el tamaño de la biblioteca real requerido para la obtención eficaz de muestras de la biblioteca. Estas estrategias incluyen el diseño inteligente de bibliotecas sintéticas o semisintéticas (Rothe, C. et al. (2008) J. Mol. Biol. 376:1182-200) y bibliotecas inmunológicas (Hoet, R. M. et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:344-8) o pseudoimmunológicas (Lee, H. W. et al. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 346:896-903) generadas a partir de repertorios de linfocitos C menos diversos pero potencialmente más reactivos. Aunque estos abordajes pueden ser eficaces en la reducción significativa de la diversidad de la biblioteca teórica mediante diversos o incluso muchos registros, la necesidad de tamaños grandes de bibliotecas y de métodos para generarlos siempre complementará los diseños de las bibliotecas con el fin de aumentar las posibilidades de identificar estas coincidencias de anticuerpos con independencia de su escasez.

La disponibilidad de medios para la producción de bibliotecas de ácidos nucleicos y productos recombinantes producidos de este modo, dichas proteínas farmacéuticas, en sistemas eucariotas tales como levaduras, proporciona ventajas significativas con respecto al uso de sistemas procariotas, tales como *E. coli*. Generalmente, las levaduras pueden crecer a densidades celulares más altas que las bacterias y son fácilmente adaptables a procesos de fermentación continua. No obstante, el desarrollo de especies de levaduras como sistemas de huésped/vector para la producción de productos recombinantes y bibliotecas se ve gravemente dificultado por la falta de conocimientos sobre las condiciones de transformación y sobre los medios adecuados para introducir de forma estable ácidos nucleicos extraños en la levadura célula huésped.

Entre los diversos parámetros eléctricos y biológicos que facilitan la electrotransformación de células se encuentra la adsorción de ADN en la superficie celular. Campos eléctricos alternos de intensidad baja también estimulan la transferencia del ADN a las bacterias de *E. coli*, posiblemente mediante la estimulación eléctrica de las ADN permeasas. Se han acumulado datos del efecto dominante de electrodifusión y electroforético sobre la transferencia génica electroporativa del ADN polielectrolitos. También se han notificado efectos electroosmóticos e invaginación de membrana mediante electroporación.

La aplicación de un campo eléctrico a través de la membrana celular de la levadura tiene como resultado la creación de poros temporales que son cruciales para el proceso de electroporación. Un generador de señal de electroporación proporciona la tensión (en kV) que viaja a través del hueco (en cm) entre los electrodos. Esta potencial diferencia define lo que se denomina la fuerza del campo eléctrico, donde E equivale a kV/cm. Cada célula

5 tiene su propia fuerza de campo crítica para una electroporación óptima. Esto se debe al tamaño de la célula, la formación de la membrana y las características individuales de la propia pared celular. Por ejemplo, normalmente las células de mamífero requieren entre 0,5 y 5,0 kV/cm antes de que se produzca la muerte celular y/o la electroporación. En general, la fuerza del campo necesaria varía de forma inversa con el tamaño de la célula.

10 Métodos de transformación

1. *Transformación mediante electroporación*

15 Becker et al. (Methods in Enzymology 194: 182-187 (1991)) divulgan métodos de transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Becker también divulga la transformación de esferoplastos.

Faber et al. (Curr. Genet. 25: 305-310 (1994)) divulgan métodos para la transformación de la levadura metilotrófica *Hansenula polymorpha*. Faber también aplicó el método a *Pichia methanolica*.

20 Helmuth et al. (Analytical Biochem. 293:149-152 (2001)) divulgan una eficiencia incrementada de la transformación de levaduras combinando los pretratamientos con LiAc y DTT.

Kasutske et al. (Yeast 8: 691-697 (1992)) divulgan transformación por electropulsos de células intactas de *Candida maltosa* mediante diferentes plásmidos vectores homólogos.

25 Meilhoc et al. (Bio/Technology 8: 223-227 (1990)) divulgan un sistema de transformación usando células intactas de la levadura *S. cerevisiae* y pulsos del campo eléctrico.

30 Neumann et al. (1996) Biophys. J. (1996) 71:868-877 divulgan la cinética de la transformación de las células de levadura mediante electroporación y adsorción de ADN mediada por calcio.

Piredda et al. (Yeast 10: 1601-1612 (1994)) divulgan un sistema de transformación para la levadura *Yamadazyma (Pichia) ohmeri*.

35 Scorer et al. (Bio/Technology 12: 181-184 (1994)) divulgan vectores de *P. pastoris* que permiten la rápida selección de G418 de transformantes con un número de copias raramente alto para la expresión en *Pichia pastoris* usando los sistemas tanto de electroporación como de transformación de esferoplastos.

40 Sherman et al. (Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, páginas 91 102, Cold Spring Harbor Laboratory (1986)) divulgan la transformación de mutantes de levaduras LEU2 e HIS3.

Suga y Hatakeyama (Curr. Genet. 43:206-211 (2003)) divulgan un método de congelación para generar células competentes antes de la electroporación con adición de calcio.

45 Thompson et al. (Yeast 14:565-571 (1998)) divulgan la preparación de células de levadura tales como *S. cerevisiae* y *Candida albicans* para la transformación mediante electroporación.

50 Yang et al. (Applied and Environmental Microbiology 60(12): 4245-4254 (1994)) divulgan la electroporación de *Pichia stipitis* basada en el gen URA3 y una secuencia de replicación autónoma ARS2.

La patente de EE.UU. Nº 5.716,808 de Raymond divulga métodos para preparar células de *Pichia methanolica* que contienen construcciones de ADN extraños usando electroporación y métodos para producir péptidos extraños en células de *Pichia methanolica*.

55 La patente de EE.UU. Nº 7.009,045 de Abbas divulga la transformación de las levaduras flavinogénicas, *Pichia guilliermondii* y *Candida famata*, mediante electroporación y mediante transformación de esferoplastos.

2. *Transformación mediante formación de esferoplastos*

60 Becker et al. (Methods in Enzymology 194: 182-187 (1991)) divulgan métodos de transformación de la levadura *S. cerevisiae*, así como transformación de esferoplastos.

65 Scorer et al. (Bio/Technology 12: 181-184 (1994)) divulgan vectores de *P. pastoris* que permiten la selección de G418 de transformantes con un número de copias raramente alto para la expresión en *Pichia pastoris* usando los sistemas tanto de electroporación como de transformación de esferoplastos.

La patente de EE.UU. Nº 4.808.537 de Stroman et al. divulga un método para aislar y clonar un gen inducible con metanol de *Pichia pastoris* y las regiones reguladoras útiles para la expresión de regulación con metanol de genes heterólogos usando transformación de esferoplastos.

5 La patente de EE.UU. Nº 4.837.148 de Cregg et al. divulga secuencias de replicación autónoma que son capaces de mantener plásmidos como elementos extracromosómicos en las cepas huésped de *Pichia*. La patente divulga adicionalmente construcciones que incluyen las secuencias de ADN así como organismos transformados producidos mediante formación de esferoplastos y proporciona procesos para producir las secuencias y construcciones de ADN de la invención, así como métodos para aislar las secuencias de cualquier fuente.

10 La patente de EE.UU. Nº 4.855.231 de Stroman et al. divulga secuencias de ADN que responden a la presencia de metanol, catabolito que no reprime las fuentes de carbono y a la carencia de fuente de carbono. La patente '231 demuestra la transformación de esferoplastos de *Pichia pastoris*.

15 La patente de EE.UU. Nº 4.879.231 de Stroman et al. divulga un método de transformación de esferoplastos para la levadura tal como *Pichia pastoris*.

La patente de EE.UU. Nº 4.882.279 de Cregg et al. divulga una técnica de transformación de esferoplastos para las levaduras del género *Pichia*, tal como *Pichia pastoris*.

20 La patente de EE.UU. Nº 5.135.868 de Cregg se refiere a un método para la modificación genómica específica de sitio de levaduras del género *Pichia*. La patente '868 usa un método de transformación de esferoplastos.

La patente de EE.UU. Nº 5.268.273 de Buckholz se refiere a un método para la transformación de esferoplastos de *Pichia pastoris*.

25 La patente de EE.UU. Nº 5.736.383 de Raymond se refiere a un método de transformación de cepas de levaduras del género *Pichia*, particularmente *Pichia methanolica*. La patente '383 se refiere además a un método de transformación de esferoplastos de levaduras del género *Pichia*, así como un método de transformación mediante electroporación.

3. Otros sistemas de transformación

35 Kunze et al. (Current Genetics 9(3): 205-209 (1985)) divulgan un método de transformación de *S. cerevisiae*, *Candida maltosa* y *Pichia guilliermondii* G266 con el plásmido pYe(ARG4)411, que contiene el gen ARG4 de *S. cerevisiae* insertado en pBR322. Kunze usó CaCl₂ en el método de transformación.

Kunze et al. (J. Basic Microbiol. 25(2): 141-144 (1985)) divulgan un método de transformación de las levaduras importantes en la industria *Candida maltosa* y *Pichia guilliermondii* G266 usando CaCl₂.

40 Kunze et al. (Acta Biotechnol. 6(1): 28 (1986)) divulgan transformaciones de las levaduras importantes en la industria *Candida maltosa* y *Pichia guilliermondii*.

45 Neistat et al. (Mol. Ge. Mikrobiol. Virusol. 12: 19-23 (1986)) (solo el resumen) divulgan la transformación de la levadura *Hansenula polymorpha*, *Pichia guilliermondii*, *Williopsis saturnus* por un plásmido portador del gen ADE2 gene de *S. cerevisiae*. El método de transformación no se divulga.

50 La patente de EE.UU. Nº 4.929.555 DE Cregg et al. divulga un método para fabricar células enteras de especies metilotróficas del género *Pichia* competentes para la transformación mediante ADN y un método para transformar con ADN las células entera de dicha especie, en particular *Pichia pastoris*.

55 La patente de EE.UU. Nº 5.231.007 de Heefner et al. divulga un método de generación y aislamiento de cepas altamente flavinogénicas de *Candida famata* que producen rendimientos de riboflavina de aproximadamente 7,0 a 7,5 gramos por litro por 6 días. El método incluye una combinación de etapas mutageneizantes repetitivas y etapas de fusión de protoplastos realizadas en la cepa parental y las cepas descendientes que se selecciona después de cada etapa de acuerdo con un protocolo de cribado.

4. Vectores, elementos ARS y bibliotecas génicas

60 Clyne, R. K. et al. (EMBO J. 14(24): 6348-6357 (1995)) se refiere a un análisis de estructura fina de ARS1, un elemento de ARS de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. La caracterización de una serie de mutaciones de delección anidadas indicó que el fragmento mínimo de ADN que abarca ARS1 es grande ya que ningún fragmento por debajo de 650 pb conservaba una actividad de ARS significativa.

65 Liauta-Teglivets, O. et al. (Yeast 11(10): 945-952 (1995)) divulgan la clonación del gen estructural de la GTP-ciclohrolasa implicada en la biosíntesis de riboflavina de una biblioteca genómica de *Pichia guilliermondii*.

Cannon, R. D. et al. (Mol. Gen. Genet. 221(2): 210-218 (1990)) divulgan el aislamiento y la secuencia de nucleótidos de un elemento de secuencia de replicación autónoma (ARS) funcional en *Candida albicans* y *S. cerevisiae*.

5 Takagi, M. et al. (J. Bacteriol. 167(2): 551-555 (1986)) divulgan la construcción de un sistema huésped-vector en *Candida maltosa* usando un sitio de ARS aislado de su genoma.

Pla, J. et al. (Gene 165(1): 115-120(1995)) se refiere a fragmentos de ADN de ARS2 y ARS3 de *Candida albicans* con actividad de replicación autónoma que se ha mostrado que estimulan la transformación genética no integrativa tanto de *Candida albicans* como de *S. cerevisiae*.

10 La patente de EE.UU. N° 5.212.087 de Fournier et al. divulga secuencias ARS que son eficaces en *Yarrowia lipolytica*, así como plásmidos que portan estas secuencias.

15 La patente de EE.UU. N° 5.665.600 de Hagenson et al. divulga plásmidos lineales de *Pichia pastoris* y fragmentos de ADN de los mismos que contienen secuencias de ARS. La patente '600 usó el sistema de transformación de esferoplastos como se describe en Cregg et al en la patente de EE.UU. N° 4.929.555.

20 La patente de EE.UU. N° 4.837.148 de Cregg et al. divulga secuencias de replicación autónoma que son capaces de mantener plásmidos como elementos extracromosómicos en las cepas huésped de *Pichia*. La patente '148 se refiere adicionalmente a construcciones que incluyen las secuencias de ADN así como organismos transformados con ellas. La patente proporciona adicionalmente procesos para producir las secuencias de ADN y construcciones de la invención, así como métodos para aislar las secuencias de cualquier fuente.

25 Chao et al. (Nature Protocols, 1(2):755-768 (2006)) divulga un protocolo para transformar células de levadura mediante electroporación y alcanzar un tamaño máximo de la biblioteca de 5×10^7 con $5 \mu\text{g}$ de inserto y $1 \mu\text{g}$ del ADN del vector.

30 Los métodos y divulgaciones anteriores, aunque alcanzar una eficiencia de transformación cada vez mayor siguen siendo laboriosos y requieren un tiempo significativo y esfuerzos repetidos para acumular múltiples bibliotecas pequeñas en los intervalos de tamaño 10^6 a 10^7 a un tamaño de biblioteca más grande y combinado en un intervalo de tamaño de 10^8 a 10^9 .

35 Las bibliotecas de levaduras no han alcanzado el tamaño de eficiencia que se ha conseguido con las bibliotecas de fagos. Como ha revisado Hoogenboom en 2005 (Nature Biotech., 23(9): 1105-1116), un tamaño máximo de la biblioteca de fagos es de 10^{10} a 10^{11} , mientras que una biblioteca de levaduras típica tiene un tamaño de 10^7 (significativamente más pequeña que los alcanzados por otras tecnologías de expresión (Hoogenboom, H. R. (2002) Methods Mol. Biol. 178:1-37; Hoogenboom, H. R. (2005) Nat. Biotechnol. 23:1105-16), aunque anteriormente se han notificado tamaños de biblioteca en el intervalo de 10^9 (Hoet, R. M. et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:344-8; Lipovsek, D. et al. (2007) J. Mol. Biol. 368:1024-41; Segal, L. et al. (2007) Bioinformatics 23:i440-9. Feldhaus et al. (Nature Biotech., 21:163-170 (2003)) ha mostrado que se puede construir una biblioteca de $1,5 \times 10^9$ mediante repetición laboriosa de la transformación y, después, la combinación de las bibliotecas transformadas. Aunque el reciente progreso en los protocolos de electroporación (véase Chao, Nature Protocols 1(2):755-768 (2006)) ha hecho posible conseguir un tamaño máximo de biblioteca de levaduras 5×10^7 en una transformación única, los autores han descubierto que el protocolo de Chao normalmente transforma la levadura con una eficiencia de transformación significativamente menor. Todavía es una afirmación correcta que los tamaños de la biblioteca de levaduras conseguidos hasta la fecha todavía son significativamente inferiores a lo que se puede conseguir de forma rutinaria mediante bibliotecas de expresión en fagos del tamaño de 10^{10} a 10^{11} .

50 La selección de la biblioteca de expresión en levaduras, usando perlas magnéticas y clasificación celular activada por fluorescencia, ofrece un método eficiente y sensible para enriquecer aglutinantes específicos a los antígenos diana, en particular por su compatibilidad con la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). No obstante, la ventaja de esta potencia de selección se ve dificultada por el tamaño limitado de las bibliotecas de expresión en levaduras debido a la baja eficiencia de la transformación de las células de levadura. Si la tecnología de selección de la expresión en levaduras pudiera acoplarse con bibliotecas de anticuerpos grandes similares a las fabricadas para expresión en fagos (de un tamaño de aproximadamente 10^{10}), la tecnología de expresión en levaduras proporcionaría una herramienta de descubrimiento de anticuerpos extremadamente eficaz.

60 Por tanto, existe la necesidad de métodos eficientes para producir bibliotecas de proteínas, por ejemplo bibliotecas de anticuerpos, usando levaduras.

Sumario de la invención

65 La invención proporciona métodos rápidos y altamente eficientes de transformación de células de levadura, por ejemplo para la producción de biblioteca de células de levadura hasta un tamaño de 2×10^{10} . Los métodos de la invención hacen posible conseguir rendimientos a la escala de las bibliotecas de fagos. Los métodos de la invención eliminan un significativo cuello de botella en la aplicación de la tecnología de expresión en levaduras como

herramienta práctica para acceder a un espacio de diversidad de anticuerpos mucho mayor no explorada anteriormente y el tamaño de la biblioteca ahora solo está limitado por el tamaño del cultivo de levaduras que se puede cultivar en los laboratorios.

5 Múltiples componentes y condiciones, incluyendo el uso de CaCl_2 , MgCl_2 , sacarosa, sorbitol, acetato de litio, ditiotreitól, la tensión de electroporación, la entrada de ADN y el volumen celular se analizaron o titularon para identificar la mejor combinación. Aplicando este recién desarrollado método se construyó una biblioteca de 2×10^{10} anticuerpos a partir de ARN de bazo humano esencialmente en un día con una eficiencia de transformación típica de $1 - 1,5 \times 10^8$ transformantes por microgramo de ADN del vector. El análisis de la secuencia confirmó la diversa
10 representación de las secuencias de la línea germinal de anticuerpos dentro de esta biblioteca de anticuerpos de bazo humano no inmunes. Realizando selecciones piloto de bibliotecas, los autores han identificado anticuerpos humanos contra el TNF- α y la IL-18 con bajas afinidades nanomolares, lo que demuestra la productividad de esta biblioteca. En un aspecto, la invención proporciona un método de preparar una biblioteca de levaduras mediante electroporación de células de levadura, comprendiendo el método las etapas de:

15 incubar las células de levadura en una solución que comprende LiAc de 0,01 a 1,0 M y DTT de 1 a 100 mM, y Proporcionar una suspensión que comprende ADN de vector, ADN de inserto, células de levadura, sorbitol de 0,1 a 10 M y CaCl_2 o MgCl_2 de 0,1 a 10 mM y electroporación de la suspensión a de 0,5 kV/cm a 12,5 kV/cm con una capacitancia de 10 a 50 μF . En una realización, la invención proporciona métodos para transformar
20 levaduras con ADN para preparar una biblioteca de levaduras, comprendiendo el método las etapas de:

cultivar células de levadura a una DOD_{600} de 1,0 a 2;
lavar las células de levadura en agua;
lavar las células de levadura en una solución que comprende sorbitol y CaCl_2 ;
25 incubar las células de levadura en una solución que comprende LiAc de 0,01 a 1,0 M y DTT de 1 a 100 mM;
lavar las células de levadura en una solución que comprende sorbitol y CaCl_2 ;
resuspender las células de levadura en una solución que comprende sorbitol de 0,1 a 10 M y CaCl_2 o MgCl_2 de 0,1 a 10 mM para formar una suspensión de electroporación de las células de levadura.
añadir un volumen de la suspensión de electroporación de las células de levadura al ADN del vector y al ADN
30 del inserto para formar una suspensión de electroporación de células de levadura – ADN; y
electroporación de la suspensión de electroporación de células de levadura – ADN a una tensión de entre 2,5 kV/cm and 12,5 kV/cm en una cubeta de hueco de 0,2 cm.

La proporción entre el ADN del vector y el ADN del inserto está en el intervalo de aproximadamente 1:0,5 a
35 aproximadamente 1:10, por ejemplo 1:0,5, 1:1; 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, o 1:10. En una realización se usan aproximadamente 1 μg del ADN del vector y aproximadamente 1 μg del ADN del inserto en una reacción. En otra realización se precipitan aproximadamente 1 μg del ADN del vector y aproximadamente 2 μg del ADN del inserto. En otra realización se precipitan aproximadamente 1 μg del ADN del vector y aproximadamente 3 μg del ADN del inserto. En otra realización más se precipitan aproximadamente 1 μg del ADN del vector y aproximadamente 4 μg
40 del ADN del inserto. En otra realización más se precipitan aproximadamente 1 μg del ADN del vector y aproximadamente 5 μg del ADN del inserto.

En una realización, la suspensión celular comprende de 50 a 400 μl de células de levadura, por ejemplo 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 μl de células de levadura.
45

En una realización, la suspensión de células de levadura es de 1 a 10×10^9 células de levadura / ml, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10×10^9 células de levadura / ml.

En una realización, la fuerza de campo usada para electroporar las células de levadura era de 0,5 kV/cm a 12,5 kV/cm, por ejemplo, 0,5, 1,0, aproximadamente 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, kV/cm.

En una realización, las células de levadura se electroporan a una capacitancia de 10 a 50 μF , por ejemplo 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50.
55

En una realización, las células de levadura se suspenden en sorbitol de 0,1 a 10M y CaCl_2 o MgCl_2 de 0,1 a 10 mM, por ejemplo sorbitol 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, o 10,0 M o, por ejemplo, CaCl_2 o MgCl_2 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, o 10,0 mM.

En una realización, las células de levadura se incuban en LiAc de 0,01 a 1,0 M, por ejemplo LiAc 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, aproximadamente 0,7, 0,8, 0,9, o 1,0 M y DTT de 1 a 100 mM, por ejemplo DTT 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, aproximadamente 70, 80, 90 o 100 mM.
60

En una realización concreta, la invención proporciona métodos para transformar levaduras con ADN, comprendiendo el método dos o más etapas de: (a) minimizar el volumen del ADN del vector y del inserto en una proporción de
65 aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:10 mediante la precipitación del ADN en un sedimento, seguido de

resuspensión en un volumen mínimo; (b) cultivar las células de levadura de una colonia a un estado de crecimiento adecuada mediante (i) inoculación de un primer volumen de medio con una colonia de levaduras de una placa de crecimiento o una porción de un cultivo de levaduras en crecimiento; (ii) cultivar las células de levadura durante la noche a 30 °C; (iii) inocular un segundo volumen de medio con las células de la etapa (ii) y cultivar las células a 30 °C hasta que alcanzan una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1,6; (c) sedimentar las células de levadura mediante centrifugación; (d) lavar las células de levadura con agua fría; (e) lavar las células de levadura con sorbitol 1M frío/CaCl₂ 1 mM; (f) resuspender las células de levadura en LiAc 0,1M / DTT 10 mM; (g) incubar las células de levadura a 30 °C a 250 rpm durante 30 minutos; (h) lavar las células de levadura con sorbitol 1M/CaCl₂ 1 mM; (i) resuspender las células de levadura en sorbitol 1M/CaCl₂ 1 mM para formar una suspensión de electroporación de células de levadura; (j) añadir una porción de la una suspensión de electroporación de células de levadura al sedimento de ADN para formar una suspensión de electroporación de células de levadura - ADN; (k) electroporación de la suspensión de electroporación de células de levadura – ADN en un intervalo de 0,5 kV a 2,5 kV y una capacitación de 25uF; (l) añadir una mezcla de 1:1 de sorbitol 1M /YPD (concentración final: sorbitol 0,5M, 0,5x YPD) a la suspensión de electroporación de células de levadura electroporadas – ADN e incubar a 30 °C durante 1 hora; y (m) sedimentar las células de levadura y resuspender en 10 ml de sorbitol 1 M.

Breve descripción de las figuras

Los objetos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención, así como la propia invención, se entenderá más completamente a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas cuando se leen junto con las figuras acompañantes, en las que:

La Figura 1 muestra una representación gráfica de los datos en la Tabla 1, que representa el recuento de colonias como una función del vector: inserto y de 2,5 kV/cm a 12,5 kV/cm de tensión.

La Figura 2 muestra una representación gráfica de los datos en la Tabla 3, que representa el recuento de colonias como una función del vector: inserto y de 2,5 kV/cm a 12,5 kV/cm de tensión.

La Figura 3 demuestra que la eficiencia de la electroporación mejora significativamente aumentando el volumen por cubeta.

La Figura 4 demuestra que la entrada de ADN incrementada y la tensión elevada, pero no la proporción entre el vector y el inserto, son cruciales para una eficiencia máxima de la transformación.

Descripción detallada de la invención

Se estableció un protocolo de electroporación muy eficiente para *Saccharomyces cerevisiae* analizando y combinando varias condiciones anteriormente identificadas (Chao, G. et al. (2006) Nat. Protoc. 1:755-68; Becker, D. M. y Guarente, L. (1991) Methods Enzymol. 194:182-7; Helmuth, M. et al. (2001) Anal. Biochem. 293:149-52; Neumann, E. et al. (1996) Biophys. J. 71:868-77; Simon, J. R. (1993) Methods Enzymol. 217:478-83; Suga, M. y Hatakeyama, T. (2003) Curr. Genet. 43:206-11; Thompson, J. R. et al. (1998) Yeast 14:565-71. Estos incluyen la combinación de acetato de litio (LiAc) y ditiotreitolo (DTT) así como agentes de acondicionamiento celular, ambos usados para potenciar la frecuencia de la transformación de las levaduras (Helmuth, M. et al. (2001) Anal. Biochem. 293:149-52; Thompson, J. R. et al. (1998) Yeast 14:565-71; Gietz, R. D. et al. (1995) Yeast 11:355-60), y la inclusión de sorbitol y cloruro cálcico (Becker, D. M. y Guarente, L. (1991) Methods Enzymol. 194:182-7; Helmuth, M. et al. (2001) Anal. Biochem. 293:149-52; Neumann, E. et al. (1996) Biophys. J. 71:868-77) en el tampón de electroporación.

Definiciones:

La expresión "vector de expresión" significa una construcción de ADN que incluye un sitio autónomo de replicación (ARS), un sitio de iniciación de la transcripción y al menos un gen estructural que codifica una proteína que se va a expresar en el organismo huésped. Un sitio de replicación u origen de replicación es cualquier secuencia de ADN que controla la replicación de la clonación y los vectores de expresión. Un vector de expresión normalmente contiene también regiones de control adecuadas, tales como uno o más potenciadores y/o estimuladores, supresores y/o silenciadores y terminadores que controlan la expresión de la proteína en la levadura huésped. Los vectores de expresión de acuerdo con la presente invención también pueden contener un marcador de selección que comprende un gen esencial como se ha descrito en el presente documento. El vector de expresión también contiene opcionalmente otros marcadores seleccionables disponibles ampliamente y bien conocidos para los expertos en la técnica. Los vectores de expresión son un tipo de vector. Los vectores pueden incluir opcionalmente una o más secuencias (elementos) ARS de una o más cepas de levadura.

La expresión "unido de forma operable" significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para los fines para los que están destinados, por ejemplo la transcripción se inicia en un promotor y procede a través del segmento de codificación al terminador.

El término “transformación” significa la introducción de ADN u otros ácidos nucleicos en una célula huésped de levadura receptora que cambia el genotipo.

5 El término “transformante” o una “célula transformada” significa una célula huésped de levadura receptora, y la progenie de la misma, que ha sufrido transformación.

10 Los vectores útiles en los métodos de electroporación de la invención incluyen el vector pYD, cualquier otro vector y sus construcciones derivadas que se pueden propagar mediante las células de levadura o ácidos nucleicos en general. El vector de expresión de la presente invención puede basarse en cualquier tipo de vector, siempre que el vector pueda transformar, transfectar o transducir una célula de levadura huésped. En una realización preferida, el vector de expresión se basa en un plásmido de levadura, especialmente uno de *S. cerevisiae*. Tras la transformación de las células de levadura, el ADN exógeno que codifica las secuencias de la biblioteca es captado por las células y después es expresado por las células transformadas.

15 Más preferentemente, el vector de expresión puede ser un vector lanzadera de levaduras-bacterias que se puede propagar en *E. coli* o levaduras (Struhl, et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76:1035-1039). La inclusión de las secuencias de ADN de plásmido en *E. coli*, tales como pBR322, facilita la preparación cuantitativa del ADN del vector en *E. coli* y, por tanto, la transformación eficiente de la levadura.

20 Los tipos de vectores plasmídicos de levaduras que pueden servir como lanzadera pueden ser un vector de replicación o un vector de integración. Un vector de replicación es un vector de levadura que es capaz de mediar en su propio mantenimiento, con independencia del ADN cromosómico de la levadura, en virtud de la presencia de un origen funcional de replicación del ADN. Un vector de integración depende de la recombinación con el ADN cromosómico para facilitar la replicación y, por tanto, el mantenimiento continuado del ADN recombinante en la
 25 célula huésped. Un vector de replicación puede ser un vector plasmídico basado en 2 micrómetros donde el origen de replicación del ADN deriva de la levadura plasmídica endógena de 2 micrómetros. Como alternativa, el vector de replicación puede ser un vector de replicación autónoma (ARS) donde el origen “aparente” de replicación deriva del ADN cromosómico de la levadura. Opcionalmente, el vector de replicación puede ser un plásmido centromérico (CEN) que porta además de uno de los orígenes de replicación de ADN anteriores, una secuencia de ADN
 30 cromosómico de levadura del que se sabe que aloja un centrómero.

Los vectores se pueden transformar en células de levadura en forma de círculo cerrado o en una forma lineal. La transformación de la levadura mediante vectores de integración, aunque con una estabilidad heredable, puede no ser eficiente cuando el vector está en forma de círculo cerrado (p. ej., que da solo aproximadamente 1-10
 35 transformantes por µg de ADN). Los vectores linealizados, con extremos libres localizados en las secuencias de ADN homólogas con el ADN cromosómico de levadura, transforman las levaduras con una eficiencia más alta (100-1.000 veces) y el ADN transformante generalmente se encuentra integrado en secuencias homólogas al sitio de escisión. Por tanto, escindiendo el ADN del vector con una endonucleasa de restricción adecuada, es posible aumentar la eficiencia de la transformación y apuntar al sitio de integración del cromosoma. La transformación
 40 integrativa puede ser aplicable a la modificación genética de la levadura de fermentación, lo que proporciona que la eficiencia de la transformación es lo bastante alta y la secuencia del ADN diana para la integración está dentro de una región que no altera los genes esenciales para el metabolismo de la célula huésped.

45 Los plásmidos de ARS, que tienen un número de copias elevado (aproximadamente 20-50 copias por célula), tienden a ser los más inestables y se pierden a una frecuencia superior al 10 % por generación. No obstante, la estabilidad de los plásmidos de ARS se puede potenciar mediante la unión de un centrómero; los plásmidos centroméricos están presentes a 1 o 2 copias por célula y se pierden únicamente a aproximadamente 1 % por generación. Ejemplos no limitantes de proteínas para la expresión por las células huésped de levaduras usando los métodos de electroporación de la invención incluyen cualquier gen de interés incluyen anticuerpos y fragmentos de
 50 anticuerpos, hormonas, citocinas y linfocinas, receptores, moléculas de adhesión y enzimas.

Las cepas de levadura que se pueden transformar mediante el método de electroporación de la invención incluyen especies de levadura en el género *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, y el género *Schizosaccharomyces*, tal como *Schizosaccharomyces Pombe*. En una realización, las células de levadura son
 55 células de levadura diploides. Como alternativa, las células de levadura son células haploides, tales como la cepa “a” y “α” de las células haploides de levadura.

La invención proporciona métodos para la transformación de células de levadura que comprenden electroporación de una suspensión celular que contiene levaduras junto con una o más construcciones de ácido nucleico. La transformación de las células de levadura puede dar como resultado desde uno cualquiera de un único clon hasta la población de de células de levadura (es decir, biblioteca o bibliotecas de levadura) que se pueden usar para cribar
 60 (a) péptido(s) o proteína(s) expresadas sobre la superficie de las células de levadura por medio de unión a una proteína de la superficie de la levadura o asociación a través de un enlace covalente específico o una interacción no covalente con proteínas de la superficie de la célula de levadura u otros componentes; (b) péptido(s) o proteína(s) expresados intracelularmente; o (c) péptido(s) o proteína(s) que se secretan en un espacio extracelular, tal como
 65 medios de cultivo, o se depositan sobre una superficie sólida. Dichas bibliotecas de levadura pueden ser

susceptibles de forma conveniente a múltiples aplicaciones para cribar o caracterizar interacciones entre el o los péptidos o proteínas con otra proteína, péptido, ADN, ARN u otras materias químicas que se pueden introducir en las células de levadura o añadir de forma exógena. Ejemplos específicos son los hallados en expresión en levaduras, dos híbridos de levaduras, tres híbridos de levaduras etc.

5 La invención proporciona un método para la transformación de las células de levadura que comprende electroporar una suspensión celular que contiene levaduras junto con una o más construcciones de ácido nucleico que comprenden una o más secuencias reguladoras y uno o más genes o segmentos de genes, usando uno o más de resistencia, fuerza de campo y duración de pulso suficientes para transformar las células de levadura.

10 En una realización, la fuerza de campo es de 2,5 kV/cm a 12,5 kV/cm. En ciertas realizaciones, la fuerza de campo es de 0,5 kV/cm, 1,0 kV/cm, 1,5 kV/cm, 2,0 kV/cm, o 2,5 kV/cm. Estos valores tienen en cuenta que la cubeta de electroporación tiene un hueco de 0,2 cm. Las fuerzas de campo más altas son posibles pero su utilidad depende considerablemente del desarrollo de un aparato que puede liberar un pulso más fuerte.

15 En una realización, la duración del pulso es de aproximadamente 3 milisegundos a aproximadamente 10 milisegundos. En una realización concreta, la duración del pulso es de aproximadamente 4,8 milisegundos.

20 El tratamiento de las células mediante los métodos de electroporación de la invención se lleva a cabo aplicando un campo eléctrico a una suspensión celular de levaduras entre un par de electrodos. La fuerza del campo se debe ajustar de una forma razonablemente precisa de forma que la electroporación de las células se produzca sin daños o con daños mínimos en las células. La distancia entre los electrodos se puede medir y después se puede aplicar a los electrodos una tensión adecuada de acuerdo con la fórmula $E=V/d$ (E = fuerza de campo en V/cm; V = tensión en voltios; y d = distancia en cm).

25 Los generadores de pulsos para llevar a cabo los procedimientos descritos en el presente documento y han estado disponibles en el mercado durante una serie de años. Un generador de señales adecuado es en Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Una situación típica consiste en el Gene Pulser II conectado a un expansor de capacitancia plus y los módulos de controlador de pulso plus.

30 Los modelos de electroporación adicionales disponibles comercialmente incluyen el sistema Gene Pulser MXcell o el sistema eucariótico Gene Pulser X cell (Bio-Rad), el CelljecT Pro Electroporator (Thermo Scientific), los sistemas Multiporator Electroporation y otros sistemas Eppendorf® Electroporation Systems (Eppendorf, North America), generadores de electroporación ECM y el sistema BTX® HT 96 Well Electroporation System (BTX, Harvard apparatus), todos los cuales son aparatos adecuados para la electroporación de las células de levadura usando las condiciones divulgadas en el presente documento.

35 La electroporación se usa en la presente invención para facilitar la introducción de ADN en células de levadura. La electroporación es el proceso del uso de un campo eléctrico pulsado para permeabilizar transitoriamente las membranas celulares, lo que permite que las macromoléculas, tales como el ADN, entre a las células. No obstante, el mecanismo real por el cual el ADN se transfiere al interior de las células no se entiende bien. Para la transformación de *Candida famata*, por ejemplo, la electroporación es sorprendentemente eficiente cuando las células se exponen a un campo eléctrico pulsado decadente experimentalmente que tiene una fuerza de campo de aproximadamente 10 a aproximadamente 13 kV/cm y un valor de resistencia de aproximadamente R5 (129 ohmios), y un tiempo constante de aproximadamente 45 ms. Normalmente, la resistencia y la capacitancia están presentes o las puede seleccionar el usuario, dependiendo del equipo de electroporación seleccionado. En cualquier caso, el equipo se configura de acuerdo con las instrucciones del fabricante para proporcionar fuerza de campo y parámetros de desactivación según sea adecuado.

40 La invención se refiere además a métodos muy eficientes de transformación de levaduras que permiten un nivel alto de expresión de uno o más genes deseados endógenos (es decir, que existen de forma natural en dicha célula de levadura) o heterólogos. Los métodos de la invención se refieren adicionalmente a un método para preparar bibliotecas, por ejemplo, que expresan anticuerpos o quimeras o fragmentos de los mismos.

45 En un escenario, los vectores de expresión portadores de genes de interés se pueden transformar en células huésped de levaduras mediante electroporación para generar un único clon o una biblioteca compuesta por muchas células transformadas que expresan proteínas intracelulares (p. ej., proteínas nucleares o citoplásmicas), proteínas de membrana (p. ej., proteínas que atraviesan la membrana o proteínas unidas a la membrana) o proteínas secretadas. Se podrá usar las células transformadas o bibliotecas para purificar proteínas, estudiar las funciones de la proteína, identificar las interacciones proteína-proteína o identificar nuevos aglutinantes de proteínas o parejas de interacción. Cabe destacar la capacidad para generar bibliotecas de levaduras muy grandes que muestran o expresan anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. La biblioteca se puede someter a la selección por antígenos diana para identificar anticuerpos que se unen a los antígenos de selección.

50 Dado que las levaduras transformadas tienen una tendencia a perder los plásmidos construidos artificialmente, es ventajoso usar un medio de cultivo para ejercer una presión de selección positiva sobre ellos. Cuando la cepa es un

mutante auxótrofo para un metabolito esencial y cuando el plásmido vector usado comprende un gen marcador capaz de restablecer la prototrofia de la cepa, por ejemplo el gen LEU2 mencionado anteriormente, esta presión de selección se puede ejercer omitiendo el metabolito del medio de cultivo. Existe otro medio para obtener el mismo resultado y también se puede usar para poner en práctica la invención.

5 Dependiendo de la naturaleza del gen estructural de interés, el producto o el producto de expresión pueden permanecer en el citoplasma de la célula huésped de levadura o se secretan. Se ha encontrado que no solo las proteínas que permanecen en la célula, sino también las que se secretan, son solubles. Cuando el producto o el producto de expresión van a permanecer en la célula huésped de levadura, generalmente puede ser deseable tener una región de iniciación de la transcripción inducible, de forma que hasta que el transformante ha alcanzado una densidad elevada, hay poca o ninguna expresión o producción del producto deseado. Después de un tiempo suficiente para el producto o el producto de expresión que se va a expresar, las células se pueden aislar por medios convencionales, por ejemplo centrifugación, lisis y el producto de interés aislado. Dependiendo de la naturaleza y el uso del producto, el lisado puede someterse a varios métodos de purificación, tal como cromatografía, electroforesis, extracción de disolvente, cristalización, diálisis, ultrafiltración o similares. Los métodos de cromatografía incluyen, entre otros, cromatografía de gases, HPLC, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico y otros métodos de cromatografía conocidos por los expertos en la técnica. El grado de pureza puede variar de aproximadamente 50% a 90% o superior, preferentemente hasta aproximadamente 100 %.

20 Como alternativa, el producto de expresión o producto de interés se puede secretar en el medio de cultivo y producir de forma continua, cuando se retira parcialmente el medio, el producto deseado extraído, por ejemplo mediante cromatografía en columna o de afinidad, ultrafiltración, precipitación o similares, y el medio gastado se desecha o recircula mediante restablecimiento de los componentes esenciales. El permeado que contiene el producto de la ultrafiltración puede someterse adicionalmente a concentración, también por evaporación, seguido de cristalización o precipitación usando alcohol y/o ajuste de pH. Los expertos en la técnica conocen las muchas opciones de procesos. Cuando el producto se va a secretar, normalmente se usará una región constitutiva de iniciación de la transcripción, aunque se pueden usar regiones no constitutivas.

30 A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de nucleótidos recién descritas en el presente documento se determinaron usando un secuenciador de ADN automático (tal como, por ejemplo, el modelo 377 de PE Applied Biosystems, Inc.). Por tanto, como se sabe en la técnica, para cualquier secuencia de ADN determinada por este abordaje automatizado, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en el presente documento puede contener algunos errores. Normalmente, las secuencias de nucleótidos determinadas mediante automatización tienen una identidad de al menos aproximadamente un 90%, más normalmente de al menos aproximadamente un 95 % a al menos aproximadamente un 99,9% con la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse de un modo más preciso mediante otros abordajes, incluyendo métodos de secuenciación de ADN manuales bien conocidos en la técnica.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación del ADN del vector

45 El vector pYDsTev se digirió con las enzimas de restricción SfiI y NotI para usar en la recombinación con los scFv + fragmentos de ADN de 300 pb. Para mejorar la eficiencia y prevenir la transformación del vector sin cortar, el vector digerido con SfiI/NotI se digirió adicionalmente con BglII y HpaI (ambos cortados dentro del relleno).

50 El ADN digerido se purificó usando Sureclean de Bionline (Randolph, MA). En resumen, la digestión de restricción se mezcló con un volumen igual de Sureclean. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13,2k rpm. Se desechó el sobrenadante y los sedimentos se lavaron con 2,5 x el volumen de la muestra de etanol al 70 %. Después, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13,2k rpm. Se retiró el sobrenadante y los sedimentos se secaron al aire. Los sedimentos se resuspendieron en 5-10 µl de TE a pH 8.

Ejemplo 2: Preparación del ADN del inserto

55 El ADN del inserto se prepara usando PCR para amplificar un inserto de interés añadiendo suficiente secuencia del vector 5' y 3' (por ejemplo, aproximadamente 300 pares de bases) al inserto para realizar eficientemente la recombinación homóloga.

60 Se diseñaron cebadores de la región constante de inmunoglobulina (Tabla 2) que hibridan a IgM e IgG (para ADNc de IgM/G) o IgK (ADNc de IgK) de las inmunoglobulinas para la síntesis del ADNc de 1ª hebra. Específicamente, para los cebadores de ADNc de IgM/G se usaron FcgRev1, 2, y 3 y FcmRev1, 2 y 3. Para la síntesis de ADNc de 1ª hebra de IgK se usaron Ckrev1, 2 y 3.

65 Las reacciones de síntesis de ADNc se realizaron usando el kit de síntesis de 1ª hebra de Invitrogen usando los cebadores anteriores.

Tabla 1: Reacciones de PCR de ejemplo (Etapa 1)

ADNc de IgM/G	ADNc de IgK
20 µl de ARN de bazo CloneTech poliA 50 ng/µl	10 µl de ARN de bazo CloneTech polyA 50 ng/µl
3 µl de FcgRev1 300 ng/µl	1,5 µl de CkRev1 300 ng/µl
3 µl de FcgRev2 300 ng/µl	1,5 µl de CkRev2 300 ng/µl
3 µl de FcgRev3 300 ng/µl	1,5 µl de CkRev3 300 ng/µl
3 µl de FcmRev1 300 ng/µl	10 µl de dNTP (10 mM)
3 µl de FcmRev2 300 ng/µl	<u>75,5 µl de agua dd</u>
3 µl de FcmRev3 300 ng/µl	100 µl de volumen total
20 µl de dNTP (10 mM)	
<u>142 µl de agua dd</u>	
200 µl de volumen total	
50 µl/rxn, reacciones a 65 °C durante 5', después hasta 4 °C durante 1 minuto	

Tabla 2: Oligonucleótidos usados en este estudio

Nombre del oligo	Secuencia	Descripción	SEC ID N°
Ckrev1	TCCACCTTCCACTG	Cebador inverso Ck	SEC ID N°: 1
Ckrev2	CAGGCACACAACAG	Cebador inverso Ck 2	SEC ID N°: 2
Ckrev3	GAGTGTCACAGAGC	Cebador inverso Ck 3	SEC ID N°: 3
FcGrev 1	AGTTCCACGACACC	Cebador inverso de IgG	SEC ID N°: 4
FcGrev2	GAAGGTGTGCACG	Cebador inverso de IgG	SEC ID N°: 5
FcGrev	CCACGCTGCTGAG	Cebador inverso de IgG	SEC ID N°: 6
FcMrev1	ACTTTGCACACCAC	Cebador inverso de IgM	SEC ID N°: 7
FcMrev2	TTTGTTGCCGTTGG	Cebador inverso de IgM	SEC ID N°: 8
FcMrev3	GGGAATTCTCACAGG	Cebador inverso de IgM	SEC ID N°: 9
PYD5prev	GCGCCCTGAAAATA CAGGTTTTTC	Hibrida aguas arriba inmediatas del sitio de Sfil en el vector pYD. Usado junto con el cebador 5107 para genera runa extensión de 300 pb añadida a scFv para potenciar la eficiencia de la recombinación homóloga	SEC ID N°: 10

5 **Etapa 2 de síntesis:**

A cada 50 µl de reacción enfriados se añadieron 45 µl de la Mezcla Maestro (reserva preparada que comprende 80 µl de tampón RT (10x) 160 µl de MgCl₂, 80 µl de DTT 0,1M, 40 µl de RNase Out) y los tubos se colocan a 42 °C durante 2 minutos. A cada tubo de reacción se añadieron 5 µl de la transcriptasa inversa SuperscriptII y se incubaron a 42 °C durante 50 minutos, se transfirieron a 70 °C durante 15 minutos y después se transfirieron a 4 °C. A cada reacción se añadieron 5 µl de RNase H y después se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Cuatro reacciones de IgG/M se combinaron y se combinaron dos reacciones de IgK.

10

Ejemplo 3: Generación de ADN de VH de IgM y de VL de IgK de bazo humano

15

La diversidad de inmunoglobulina VH y VK humana se amplificó usando cebadores de oligonucleótidos definidos por Sblattero y Bradbury (1998) Immunotechnology 3:271-278.

Reacción de VH de muestra de 8x 100 µl

80 µl	10x Tampón de reacción de PCR
8 µl	dNTP (10 mM)
32 µl	MgSO ₄ (50 mM)
8 µl	Cebador inverso de VH (20 µM)
8 µl	Mezcla equimolar de VH 1/2, VH4/5, VH3 and VH6 for (5 µM cada uno/20 µM del cebador en 3' total)
16 µl	ADNc de IgM/G
8 µl	Platinum Taq HiFi
<u>640 µl de agua dd</u>	
100 µl/rxn	

Reacción de VK de muestra de 8x 100 µl

5

80 µl	10x Tampón de reacción de PCR
8 µl	dNTP (10 mM)
32 µl	MgSO ₄ (50 mM)
8 µl	Cebador inverso de V (20 µM)
8 µl	Mezcla equimolar de VK1, VK2/4, VK3, and VK5 (5 µM de cada uno/20 µM 3' de cebador total)
16 µl	ADNc de IgK
8 µl	Platinum Taq Hi Fi
<u>640 µl de agua dd</u>	
100 µl/rxn	

Programa de la PCR

- 10
1. 94 °C 2 minutos
 2. 94 °C 30 segundos
 3. 55 °C 30 segundos
 4. 68 °C 30 segundos
 5. repetir la etapa 2 39 veces
 6. 68 °C/5 minutos
- 15
7. Mantener a 4 °C

Las reacciones se purificaron en geles de agarosa GTG al 1 % Las bandas del tamaño correcto, aproximadamente 400 pb, se purificaron usando un kit de extracción Qiaquick Gel Extraction. Se usaron 0,4 mg de agarosa que contiene ADN por columna de espín. Las muestras se eluyeron con 50 µl de EB previamente calentadas hasta 55 °C. Las muestras similares se combinaron y se determinó la A_{260/280} usando un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware).

Ejemplo 4: Generación de scFv de VH/VK

25 Los scFv de VH/VK se generaron mediante PCR de corte y empalme por extensión solapante (SOE). Los cebadores directo VH e inverso VK han compartido homología que generan el enlazador (Gly₄Ser)₃ que conecta las regiones VH y VL para generar la molécula de scFv. Las reacciones se montaron del siguiente modo:

24 rxns a 100 µl/rxn (ensamblaje de VH10/VK como ejemplo)

30

240 µl	10x tampón Plat Taq Hi Fi
24 µl	dNTP (10 mM)
96 µl	MgSO ₄ (50 mM)
24 µl	scFv Rev (20 µM)
24 µl	scFv For (20 µM)
141 µl	VH10back (24 pmol of VH/ 1 pmol por 100 µl rxn)

ES 2 531 194 T3

72 µl	mezcla equimolar de ADN de VK1, 2, 9, y 12 (24 pmol total/0,25 pmol de cada VK por 100 µl rxn)
24 µl	Platinum Taq HiFi
1755 µl	Agua dd
<hr/>	
100 µl/rxn	

Programa de la PCR

- 5
1. 94 °C 2 minutos
 2. 94 °C 30 segundos
 3. 55 °C 30 segundos
 4. 68 °C 1 minutos
 5. Ir a la etapa 2 39x
- 10
6. 68 °C 5 minutos
 7. Mantener a 4 °C

Las bandas de scFv (aproximadamente 800 pb) se purificaron en gel como anteriormente para los fragmentos en gel de VH o VK. Las muestras similares se combinaron para su uso en PCR SOE con el fragmento de 300 pb pYD5'.

- 15
- Para garantizar las mayores eficiencias de la transformación, los autores modificaron los fragmentos de ADN del inserto que tienen aproximadamente 300 pb de homología en 5' del sitio de inserción de scFv (SfiI) en el vector pYD. Para añadir esta homología al scFv de bazo humano se diseñó un cebador complementario a la región inmediatamente aguas arriba del sitio SfiI de pYD1sTev (pYD5prev). Este cebador se usó en combinación con el cebador 5' pYD1 (5107) para generar un fragmento de aproximadamente 300 pb a añadir al scFv de bazo existente
- 20
- mediante PCR SOE.

PCR de 5107/pYD5prev

1 µl	pYDsTev (10 ng/µl)
10 µl	10x tampón Plat Taq Hi Fi
4 µl	MgSO ₄ (50 mM)
1 µl	dNTP (10 mM)
1 µl	5107 (20 µM)
1 µl	pYD5prev (20 µM)
1 µl	Platinum Taq Hi Fi
80 µl	Agua dd
<hr/>	
100 µl/rxn	

Programa de la PCR

- 25
1. 94 °C 2 minutos
 2. 94 °C 30 segundos
 3. 55 °C 30 segundos
- 30
4. 68 °C 30 segundos
 5. Ir a la etapa 2 39x
 6. 68 °C 5 minutos
 7. Mantener a 4 °C

- 35
- Las bandas de 5107/pYD5prev (aproximadamente 300 pb) se purificaron en gel como anteriormente para los fragmentos en gel de VH o VK. Las muestras similares se combinaron para su uso en PCR SOE con los scFv de bazo.

PCR de scFv+300 (mezcla 16x100 µl rxn)

- 40
- | | |
|---------|---------------------------|
| 162 µl | 10x tampón Plat Taq Hi Fi |
| 16,2 µl | dNTP (10 mM) |
| 64,8 µl | MgSO ₄ (50 mM) |
| 16,2 µl | 5107 (20 µM) |
| 16,2 µl | scFv For (20 µM) |

32,4 µl	ADN de scFV de VH/VK
16,2 µl	ADN de 5107/pYDprev5
16,2 µl	Platinum Taq HiFi
1279,8 µl	Agua dd
<hr/>	
100 µl/rxn	

Las reacciones de PCR se realizaron como para scFv anterior. Las bandas de ScFv+300bp (aproximadamente 1.100 pb) se purificaron en gel como anteriormente para los fragmentos en gel de VH o VK. Las muestras similares se combinaron para usar en las reacciones de electroporación.

5

Ejemplo 5: Protocolo de transformación de bibliotecas de levadura de la técnica anterior

Lo siguiente es un protocolo de transformación de levaduras de la técnica anterior. Se inoculan cinco ml de medio YPD con una colonia de EBY100 (aplicada recientemente en una placa YPD) y se cultiva durante la noche a 30 °C. Se inocula un cultivo de 50 ml en medio YPD hasta una absorbancia de 0,1 a 600 nm usando el cultivo durante la noche y las células cultivadas a 30 °C hasta una absorbancia de aproximadamente 1,3 a 1,5 a 600 nm durante aproximadamente 6 horas. Las células deben estar en la fase de crecimiento log de temprano a medio. Usando las células en la fase estacionaria o log tardía se disminuye sustancialmente la eficiencia de la transformación. Mientras las células crecen, el ADN se precipita para la transformación usando PelletPaint de acuerdo con el protocolo del fabricante. Normalmente, el ADN que se va a introducir en las cubetas de electroporación, cada una con 5 mg de inserto y 1 mg del vector de corte, se usa para generar una biblioteca de aproximadamente 5×10^7 . Asimismo se prepara un control de sólo el armazón. El ADN se deja en forma de sedimento. Las proporciones inserto:armazón se pueden variar de 5:1 a 1:1 con al menos 1 mg de armazón por cubeta.

10

15

20

25

30

Una vez que las células han alcanzado una absorbancia de aproximadamente 1,3-1,5 a 600 nm, se añaden 500 µl de tampón Tris-DTT al cultivo y se incuban en un agitador a 30 °C durante 15 minutos. La eficiencia de transformación es relativamente constante para tiempos de incubación en DTT de 10-20 minutos, pero disminuye considerablemente para la incubación durante 20 minutos. Las células sedimentan a 2.500 g durante 3 minutos a 4 °C y se lavaron con 25 ml de tampón E helado (Tris 10 mM pH 7,5, sacarosa 270 mM, MgCl₂ 1 mM) (p. ej., se lavaron, se volvieron a sedimentar y se aspiró el sobrenadante). Las células se lavan de nuevo con 1 ml de tampón E helado y se resuspenden en tampón E hasta un volumen total de 300 µl. Los sedimentos control de ADN se resuspenden en un volumen adecuado de suspensión celular (50 µl por cubeta). Las células se mantienen en hielo. Se alicuotan 50 µl de la mezcla de células resuspendidas – ADN por cubeta de electroporación previamente enfriada y las cubetas de electroporación se mantienen en hielo hasta los pulsos.

35

Las cubetas se cargan en un pulsador génico y se someten a electroporación a 0,54 kV y 25 µF sin un controlador del pulso. Inmediatamente a la cubeta se añaden 1 ml de medio YPD caliente (30 °C). Las constantes de tiempo típicas para electroporación varían de aproximadamente 15 ms a 40 ms sin afectar considerablemente a la eficiencia de la transformación.

40

Las células se transfieren desde las cubetas pulsadas a un tubo Falcon de 15 ml. Cada cubeta se lava con 1 ml adicional de medio YPD para recuperar las células restantes de la cubeta. Las células se agitan durante 1 hora a 30 °C. Las células se sedimentan a 2.500 g durante 5 minutos y el sobrenadante se retira y se resuspende en 10 ml de medio SDCAA. Las diluciones en serie se siembran en placas de SDCAA para determinar la eficiencia de la transformación. El control de solo el armazón deberá tener una eficiencia inferior al 1 % de la de las transformaciones de armazón más inserto. La suspensión celular se transfiere a un matraz con 100-1000 ml de medio SDCAA más pen-strep (dilución 1:100) se incuba a 30 °C durante de 24 a 48 horas. Este método se usó para generar una biblioteca de 8×10^7 y corresponde al tratamiento 7 descrito en la Tabla 3 con una eficiencia del 0,4 % en comparación con el protocolo optimizado de la invención (véase el Ejemplo 6).

45

Ejemplo 6: Protocolo de transformación de biblioteca de levaduras de la invención Método 2

La invención proporciona métodos rápidos y altamente eficientes de transformación de células de levadura, por ejemplo para la producción de bibliotecas de células de levadura hasta un tamaño de 2×10^{10} . Múltiples componentes y condiciones, incluyendo el uso de CaCl₂, MgCl₂, sacarosa, sorbitol, acetato de litio, ditiotreitól (DTT), la tensión de electroporación, la entrada de ADN y el volumen celular se analizaron y titularon para identificar las condiciones óptimas.

50

55

El protocolo de electroporación de la invención es una variación de los protocolos de Suga y Hatakeyama (2003) Curr. Genet. 43:206-211; Neumann et al. (1996) Biophys. J. (1996) 71:868-877; Thompson et al. (1998) Yeast 14:565-571; Becker y Guarente (1991) Methods Enzymol. 194.182-187; Melihon et al. (1990) Biotechnology 8:223-227; Helmuth et al. (2001) Analytical Biochem. 293:149-152; y el protocolo proporcionado en el Ejemplo 5.

Preparación de células de levadura: *S. cerevisiae* se cultivó durante la noche hasta la fase estacionaria. Una alícuota del cultivo se inoculó en 100 ml de medio YPD para alcanzar la DO_{600} de aproximadamente 0,3. Las células se cultivaron hasta alcanzar la DO_{600} de aproximadamente 1m6 antes de recolectar mediante centrifugación. El sedimento celular se lavó dos veces con agua fría, una vez con 50 ml de tampón de electroporación (sorbitol 1 M / CaCl₂ 1M) y se incubó en 20 ml de LiAc 0,1 M / DTT 10 mM a 30 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron de Nuevo con 50 ml de tampón de electroporación, después se suspendieron en 100 - 200 µl del tampón de electroporación hasta alcanzar un volumen de 1 ml. Esto corresponde a aproximadamente 1 a 10×10^9 células/ml.

Electroporación: Se usaron 100.200, 300, o 400 µl de la suspensión celular para la electroporación por cubeta y 1, 2, 3, o 4 µg del vector lializado correspondiente al inserto de ADN de 3, 6, 9 µg (proporción vector inserto; = 1:3). Las células se sometieron a electroporación a 2,5 kV y 25 µF en una cubeta de BioRad GenePulser (hueco de electrodos de 0,2 cm). La constante de tiempo de la electroporación típico varió de 3,0 a 4,5 milisegundos. Tras la electroporación, las células se suspendieron en 10 ml de la mezcla 1:1 de sorbitol 1M: medio YPD y se incubaron a 30 °C durante 1 hora. Después, se recolectaron las células y se cultivaron en medio SD-UT (-ura, -trp) que contenía 20 g/l de glucosa, 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 5,4 g/l de Na₂HPO₄, 8,6 g/l de NaH₂PO₄·H₂O y 5 g/l de ácidos casamino. El número de transformantes se determinó sembrando diluciones en serie por 10 de las células transformadas en placas SD-UT selectivas. En referencia a la Figura 3, 72 horas después se contaron las colonias y las eficiencias de transformación (A) se expresaron como la media del número de transformantes / µg del ADN del vector ± desviación estándar; y los rendimientos (B) se expresaron como la media del número total de transformantes por cubeta ± desviación estándar.

La combinación de LiAc, DTT, CaCl₂ and sorbitol produjo de forma consistente una eficiencia de transformación de $3 \pm 1 \times 10^7$ transformantes por µg de ADN del vector de 1 µg de ADN del vector y 100 µl de células de levadura a una densidad de $1,6 \times 10^9$ células/ml (determinado mediante la densidad óptica a 600 nm, suponiendo 1 DO equivale a 10^7 células) (Figura 3). Esto sugirió que aproximadamente el 2 % de las células de levadura se transformaron con éxito y se puede esperar un tamaño de biblioteca de $3 \pm 1 \times 10^7$ de una cubeta de electroporación. Para fabricar bibliotecas todavía más grandes, se evaluó el volumen celular óptimo por cubeta individual. Sorprendentemente, la eficiencia de la transformación se potenció significativamente a 1×10^8 transformantes por µg de ADN del vector cuando el volumen celular aumentó de 100 µl a 200 µl por cubeta. Al volumen celular máximo de 400 µl en una cubeta de hueco de 0,2 cm, se podían generar fácilmente bibliotecas de tamaños tan grandes como de 5×10^8 en una cubeta usando la misma densidad y proporción célula:ADN (Figura 3).

Este método de electroporación es muy reproducible, ya que se obtuvieron eficiencias de transformación similares mediante operadores diferentes y en dos electroporadores diferentes (BioRad Gene Pulser™ modelo n° 1652076 y Gene Pulser® II modelo n° 1652108).

Ejemplo 7: Eficiencias de electroporación potenciadas de *S. Cerevisiae* comparando el uso de LiAc, DTT, Sorbitol, y CaCl₂

La tabla 3 muestra las eficiencias de electroporación, rendimiento por cubeta, % de eficiencia y el tamaño máximo de la bi biblioteca para el método del ejemplo 7, así como variaciones en el método.

Tabla 3

Tratamiento	Eficiencia de la electroporación ^a × 10 ⁷	Rendimiento por cubeta ^b × 10 ⁷	% de eficiencia ^c	Tamaño máximo de la biblioteca ^d
1. Protocolo combinado	18,3 ± 2,5	73,2 ± 9,7	100	2 × 10 ¹⁰
2. Sin LiAc	1,7 ± 0,1	6,7 ± 0,4	9	1,4 × 10 ⁹
3. Sin DTT	0,81 ± 0,017	3,3 ± 0,07	4	8 × 10 ⁸
4. Sorbitol / MgCl ₂	11,4 ± 0,9	45,5 ± 3,5	62	9 × 10 ⁹
5. Solo sorbitol	9 ± 1,8	36 ± 7,1	49	8 × 10 ⁹
6. Sacarosa/CaCl ₂	0,4 ± 0,3	1,6 ± 1,5	2	3,8 × 10 ⁸
7. Sacarosa / MgCl ₂	0,09 ± 0,01	0,4 ± 0,07	0,4	8 × 10 ⁷

^a Número de transformantes por µg del ADN del vector

^d Número total de transformantes por reacción de electroporación en la cubeta

^e Suponiendo la eficiencia de transformación obtenida usando el protocolo igual al 100%

^f Suponiendo que en un día se realizan 25 reacciones de electroporación en la cubeta

El protocolo combinado es el descrito en el ejemplo 7 de una electroporación de 400 µl de suspensión de levaduras (6×10^9 /ml) con 4 µg del vector y 12 µg del inserto de ADN. Para los otros tratamientos, el protocolo combinado fue el del Ejemplo 7, a excepción de los cambios siguientes: (2) las células se trataron previamente únicamente con DTT; (3) las células se trataron previamente únicamente con LiAc; (4) se usó MgCl₂ en lugar de CaCl₂. (5) se excluyó el CaCl₂ del tampón de electroporación; (6) se usó sacarosa 270 mM en lugar de sorbitol 1M; y (7) se usó

sacarosa 270 mM / MgCl₂ 1 mM como tampón de electroporación.

Como se muestra en la Tabla 2, la eliminación del pretratamiento con DTT o LiAc produjo reducciones respectivas de la eficiencia de 93,3% y 85,7%. De un modo similar, la eliminación del sorbitol o su sustitución por sacarosa condujo a una pérdida superior a la eficiencia del 96 % (Tabla 2 y datos no mostrados). Esto es consistente con los hallazgos anteriores de que la capacidad del sorbitol para estabilizar la presión osmótica y soportar la integridad de la membrana de la levadura tras la electroporación fue al menos parcialmente responsable de alcanzar una eficiencia de transformación alta (Becker, D. M. and Guarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7; Weaver, J. C. et al. (1988) *FEBS Lett.* 229:30-4). La presencia de CaCl₂ durante la electroporación, probablemente para facilitar la unión del ADN a la membrana celular (Neumann, E. et al. (1996) *Biophys. J.* 71:868-77), parecía ser el parámetro menos crítico, ya que su eliminación solo disminuye modestamente la eficiencia de transformación en un 30 % y su sustitución por MgCl₂ solo tuvo como resultado una pequeña disminución del 11 %.

Ejemplo 8: Efecto de la tensión sobre la eficiencia de la electroporación

Se realizó un experimento para determinar el efecto de la tensión sobre la eficiencia de electroporación y determinar la mejor proporción vector: inserto. El experimento se realizó dos veces. El protocolo del ejemplo 2 se realizó usando varias tensiones en el intervalo de 0,5-2,5 kV y con varias proporciones vector: inserto en el intervalo de 1:1 a 1:10 (p/p), donde la cantidad del ADN del vector se mantuvo constante a 1µg. Todas las reacciones se concentraron y se precipitaron usando SureClean y se resuspendió el sedimento de ADN en agua dd antes de añadir la suspensión celular, como se ha descrito anteriormente.

En cada experimento se prepararon células de levadura como se ha descrito anteriormente. El volumen del vector/inserto se fijo en 11,6 µl para 5 reacciones.

Experimento 1

Tabla 4: Gráfico que representa el recuento de colonias como función del vector: inserto y fuerza del campo¹

	2,5 kV/cm	5 kV/cm	7,5 kV/cm	10 kV/cm	12,5 kV/cm
1:1	0	0	2	83	21
1:2	0	2	26	170	160
1:3	0	1	84	212	104
1:4	6	1	104	362	139
1:5	0	1	61	179	68
1:10	0	3	52	182	126

¹ Las electroporaciones se realizaron en una cubeta de hueco de 0,2 cm con tensiones que varían de 0,5 a 2,5 kV

Tabla 5: Eficiencia de transfección como función del vector: inserto y fuerza del campo¹

Eficiencia de la trans.	7,5 kV/cm	10 kV/cm	12,5 kV/cm
1:1	2,00E+06	8,30E+07	2,10E+07
1:2	2,60E+07	1,70E+08	1,60E+08
1:3	8,40E+07	2,12E+08	1,04E+08
1:4	1,04E+08	3,62E+08	1,39E+08
1:5	6,10E+07	1,79E+08	6,80E+07
1:10	5,20E+07	1,82E+08	1,26E+08

¹ Las electroporaciones se realizaron en una cubeta de hueco de 0,2 cm con tensiones que varían de 0,5 a 2,5 kV

Resultados: La transformación se detectó con una proporción 1:1 de vector:inserto en el intervalo de tensiones de 1,5 a 2,5; una proporción vector:inserto 1:2 en el intervalo de tensiones de 1,0 a 2,5; proporción vector:inserto de 1:3 en el intervalo de tensiones de 1,0 a 2,5; proporción vector:inserto de 1:4 en el intervalo de tensiones 0,5 a 2,5; proporción vector:inserto de 1:5 en el intervalo de tensiones de 1,0 a 2,5; y proporción vector:inserto de 1:10 en el intervalo de tensiones de 1,0 a 2,5. Para todas las proporciones vector:inserto se alcanzó el recuento máximo de colonias usando una tensión de 2,0 kV. Parece que las condiciones óptimas eran una proporción vector:inserto de 1:4 y una tensión de 2,0 kV, donde se alcanzó una eficiencia de la transfección de 3,62 x 10⁸.

Experimento 2**Tabla 6: Gráfico que representa el recuento de colonias como función del vector: inserto y fuerza del campo¹**

Conjunto de datos 2	2,5 kV/cm	5 kV/cm	7,5 kV/cm	10 kV/cm	12,5 kV/cm
1:1	0	1	19	65	44
1:2	0	0	45	110	154
1:3	0	1	37	92	152
1:4	0	1	50	136	160
1:5	0	1	51	116	163
1:10	0	1	0	123	167

¹ Las electroporaciones se realizaron en una cubeta de hueco de 0,2 cm con tensiones que varían de 0,5 a 2,5 kV

5

Tabla 7: Eficiencia de transfección como función del vector: inserto y fuerza del campo¹

Eficiencia de la trans.	7,5 kV/cm	10 kV/cm	12,5 kV/cm
1:1	1,90E+07	6,50E+07	4,40E+07
1:2	4,50E+07	1,10E+08	1,54E+08
1:3	3,70E+07	9,20E+07	1,52E+08
1:4	5,00E+07	1,36E+08	1,60E+08
1:5	5,10E+07	1,16E+08	1,63E+08
1:10	0,00E+00	1,23E+08	1,67E+08

¹ Las electroporaciones se realizaron en una cubeta de hueco de 0,2 cm con tensiones que varían de 0,5 a 2,5 kV

10

15

Resultados: La transformación se detectó con una proporción 1:1 de vector:inserto en el intervalo de tensiones de 1,0 a 2,5; una proporción vector:inserto 1:2 en el intervalo de tensiones de 1,5 a 2,5; proporción vector:inserto de 1:3 en el intervalo de tensiones de 1,0 a 2,5; proporción vector:inserto de 1:4 en el intervalo de tensiones 0,5 a 2,5; proporción vector:inserto de 1:5 en el intervalo de tensiones de 1,0 a 2,5; sin colonias a 1,5 kV. Para la proporción de vector:inserto 1:1 se alcanzó un recuento máximo de colonias usando una tensión de 2,0 kV. Para todas las demás proporciones vector:inserto a una tensión de 2,5 kV la tensión era óptima. Parecía que las condiciones óptimas eran una proporción vector:inserto de 1:10 y una tensión de 2,5 kV. Los resultados de este experimento indican que una tensión óptima es 2-2,5 kV, de modo que las cantidades crecientes del inserto respecto al vector no proporcionan una ventaja significativa sobre una proporción de 1:2.

Experimento 3: La entrada de ADN incrementada y tensión elevada, pero no la proporción entre el vector y el inserto, son cruciales para una eficiencia máxima de la transformación.

20

25

30

35

40

El efecto de la cantidad de ADN sobre la eficiencia de la transformación se analizó mediante electroporación de 400 µl de la suspensión celular con 1, 2, 3, 4, o 8 µg del ADN del vector, al tiempo que se mantiene la misma proporción vector:inserto de 1:3. *S. cerevisiae* se trató como se describe en el ejemplo 7. Una suspensión celular de 400 µl ($1,6 \times 10^9$ células/ml) se sometió a electroporación usando 1, 2, 3, o 4 µg del vector por cubeta (manteniendo una proporción vector:inserto = 1:3). En referencia a la Figura 4, tras 72 horas se determinó el número de colonias y se representó como (A) eficiencia de la transformación (promedio de transformantes por µg del ADN del vector \pm desviación estándar) y (B) rendimiento de la transformación (número total de transformantes por cubeta \pm desviación estándar). Adicionalmente, (C) 400 µl de la suspensión celular se sometieron a electroporación mediante 2 o 2,5 kV y proporciones vector:ADN del inserto diferentes. Las eficiencias de la transformación se expresan como promedio de transformantes por µg del ADN del vector.

Es interesante el hecho de que la eficiencia de la transformación no cambió significativamente cuando se usaron hasta 4 µg del ADN del vector para cada transformación y disminuyeron únicamente ligeramente con 8 µg del ADN del vector (Figura 4A). Como cabía esperar, el rendimiento del tamaño de la biblioteca transformada aumentó en correspondencia con las cantidades crecientes de la entrada de ADN (Figura 4B). En general, se descubrió que el uso de 4 µg del vector linealizado era la condición más conveniente y eficiente. Para explorar si se pueden reducir los 12 µg del inserto del ADN (para alcanzar una proporción vector:inserto de 1:3), se analizaron diferentes proporciones vector:inserto. Los resultados muestran que la proporción puede ser tan baja como de 1:1,5 sin que afecte negativamente a la eficiencia de la transformación (Figura 4C). No obstante, se observaron eficiencias de la transformación menores cuando la proporción inserto:vector era inferior a 1:1 o superior a 1:5 (datos no mostrados). Además, se encontró que el escenario de la tensión de la electroporación era crucial, ya que la reducción de la

tensión de la electroporación de 2,5 kV a 2 kV o menor tenía como resultado una pérdida significativa de eficiencia de transformación (Figura 4C y datos no mostrados).

Ejemplo 9: Diversidad y productividad de la biblioteca de anticuerpos de bazo humanos no expuestos anteriormente

El protocolo de electroporación de la invención se usó para generar una gran biblioteca de anticuerpos humanos. Los fragmentos de ADN de VH y Vk humanos de ARN poliA de bazo disponibles comercialmente se amplificaron por separado usando reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y los cebadores indicados anteriormente Sblattero, D. and Bradbury, A. (1998) *Immunotechnology* 3:271-8). Los fragmentos de Vk se combinaron proporcionalmente de forma que cada familia de la línea germinal estuviera representada de forma igual en la biblioteca. Los fragmentos de ScFv se prepararon por separado a partir de los fragmentos combinados de VH y Vk mediante PCR solapante. Se generaron múltiples bibliotecas de levaduras a partir de estos fragmentos de scFv mezclados con ADN del vector lineal mediante electroporación y se combinaron proporcionalmente para mantener representaciones iguales de todas las secuencias de la línea germinal de VH. Un gran número de colonias de levadura se secuenciaron para analizar la composición de la línea germinal de scFv y los resultados confirmaron una diversidad elevada. Con la excepción de los raros genes de la línea germinal de VH7 de las otras familias de genes de la línea germinal se identificaron y sus representaciones fueron aproximadamente proporcionales a su número de genes de la línea germinal de en la biblioteca de los autores (véase la Tabla 8). Dado que no se identificaron secuencias de VH idénticas, se ha estimado que la diversidad de la biblioteca tiene una probabilidad del 95 % de ser tan grande como de 10^{12} , suponiendo una diversidad teórica máxima de 10^4 para Vk y una diversidad de 10^8 para VH (aproximadamente 10^8 linfocitos B donantes) y solo está limitado por el tamaño de la biblioteca. Usando este protocolo de electroporación de levaduras altamente eficiente, ahora es posible construir bibliotecas de levadura con tamaños cercanos a los de las bibliotecas de fagos típicas (Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol. Biol.* 178:1-37; Sblattero, D. and Bradbury, A. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:75-80). De hecho, solo fue necesario un día para generar una biblioteca de levaduras de 2×10^{10} simplemente aumentando la electroporación a veinte cubetas y ahora se hacen de forma rutinaria 10^9 bibliotecas de levaduras para la maduración por afinidad y otros fines de optimización.

Tabla 8: Diversidad de la biblioteca de anticuerpos de bazo humanos no expuestos previamente

Familias de la línea germinal de VH	Distribución teórica (%)	Distribución observada en la biblioteca de bazo humana no expuesta previamente (%) (n=347)
VH1	21	15
VH2	7	5
VH3	50	62
VH4	16	16
VH4 (DP63)	2,5	3,2
VH5	0,5	0,3
VH6	2,5	1,5
VH7	0,5	0

Para demostrar que las bibliotecas construidas producen anticuerpos con una afinidad razonablemente buena, la biblioteca de anticuerpos de bazo humanos se seleccionó frente al factor α de necrosis tumoral (TNF α) inicialmente mediante clasificación celular activada por magnetismo con el fin de reducir el tamaño de la biblioteca a aproximadamente 10^7 células, seguido de múltiples rondas de FACS esencialmente como se ha descrito anteriormente (Chao, G. et al. (2006) *Nat. Protoc.* 1:755-68; Feldhaus, M. J. et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:163-70). Se identificaron múltiples aglutinantes de TNF α y sus VH derivan de las secuencias de la línea germinal humana de VH1, VH3 y VH4 and Vk de Vk1 y Vk2, lo que indica que de hecho la biblioteca producía aglutinantes de antígeno de un conjunto diverso de anticuerpos. Uno de los scFv mostró una afinidad 4 nM y otro mostró una afinidad 40 nM por el TNF α . Tras la conversión de IgG, el aglutinante 4 nM mantuvo una afinidad de unión similar (1,5 nM mediante ELISA), aunque el aglutinante de 40 nM mostró un incremento significativo de la afinidad (0,3 nM mediante ELISA). Este incremento de la afinidad aparente podría deberse a la avididad de la IgG convertida interaccionando con dos TNF α en la misma proteína de TNF α homotrímica. Selecciones de bibliotecas adicionales también han identificado anticuerpos de afinidad nanomolar baja frente a la IL-18 humana de esta biblioteca (datos no mostrados).

Usando la condición de electroporación más óptica se puede alcanzar de forma rutinaria una eficiencia de transformación de levaduras de 1×10^8 transformantes de levaduras / μ g de ADN del vector. Dado que esta eficiencia de transformación se alcanza en un volumen celular mínimo (100 μ l), es muy propensa a la automatización y a dispositivos de electroporación de múltiples pocillos. Por ejemplo, se puede concebir que estableciendo la electroporación en una placa de electroporación de 96 pocillos se puede conseguir un tamaño de biblioteca de $9,6 \times 10^9$. Cuando esta electroporación de de múltiples pocillos se repite de 10 a 11 veces manualmente o mediante automatización, se puede construir fácilmente una biblioteca de levaduras superior a 10^{11} transformantes en un día. Esta eficiencia y el posible tamaño de la biblioteca construida se acerca a la de una biblioteca de fagos típica y es

muy deseable en la maximización de la tasa de éxito del uso de la biblioteca de levaduras construida para las diversas aplicaciones que se pueden aplicar a la biblioteca, tal como expresión de anticuerpos en levaduras y selección de interacción de dos híbridos levadura.

5 **Referencias**

1. Chao, G. et al. (2006) Nat. Protoc. 1:755-68.
2. Gai, S. A. y Wittrup, K. D. (2007) Curr. Opin. Struct. Biol. 17:467-73.
3. Griffiths, A. D. et al. (1994) EMBO J. 13:3245-60.
- 10 4. He, M. y Khan, F. (2005) Expert Rev. Proteomics 2:421-30.
5. Hoogenboom, H. R. (2002) Methods Mol. Biol. 178:1-37.
6. Hoogenboom, H. R. (2005) Nat. Biotechnol. 23:1105-16.
7. Hoet, R. M. et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:344-8.
8. Rothe, C. et al. (2008) J. Mol. Biol. 376:1182-200.
- 15 9. Lee, H. W. et al. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 346:896-903.
10. Lipovsek, D. et al. (2007) J. Mol. Biol. 368:1024-41.
11. Segal, L. et al. (2007) Bioinformatics 23:i440-9.
12. Becker, D. M. y Guarente, L. (1991) Methods Enzymol. 194:182-7.
13. Helmuth, M. et al. (2001) Anal. Biochem. 293:149-52.
- 20 14. Neumann, E. et al. (1996) Biophys. J. 71:868-77.
15. Simon, J. R. (1993) Methods Enzymol. 217:478-83.
16. Suga, M. y Hatakeyama, T. (2003) Curr. Genet. 43:206-11.
17. Thompson, J. R. et al. (1998) Yeast 14:565-71.
18. Gietz, R. D. et al. (1995) Yeast 11:355-60.
- 25 19. Brzobohaty, B. y Kovac, L. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3089-93.
20. Weaver, J. C. et al. (1988) FEBS Lett. 229:30-4.
21. Sblattero, D. y Bradbury, A. (1998) Immunotechnology 3:271-8.
22. Sblattero, D. y Bradbury, A. (2000) Nat. Biotechnol. 18:75-80.
23. Feldhaus, M. J. et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:163-70.

La práctica de la invención usará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de electroporación celular y biología de células de levadura, que son bien conocidas en la técnica.

35 *Equivalentes*

Las realizaciones anteriores se deben considerar en todos los aspectos como ilustrativas y no como limitantes de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la invención está indicado en las reivindicaciones adjuntas y no en la descripción anterior y, por tanto, se pretende que todos los cambios que entren dentro del significado y del alcance de equivalencia de las reivindicaciones estén incluidos en el presente documento.

40 **Listado de secuencias**

<110> ABBOTT LABORATORIES

45 <120> MÉTODOS PARA TRANSFORMAR LEVADURAS

<130> 9161.WO.01

<140> PCT/US09/01351

50 <141> 2009-03-03

<150> 61/067.910 <151> 2008-03-03

<160> 11

55 <170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 14

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

65

ES 2 531 194 T3

<400> 1
tccacctcc actg 14

5 <210> 2
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 2

15 caggcacaca acag 14

<210> 3
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 3

25 gagtgcaca gagc 14

<210> 4
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

35 <400> 4

agttccacga cacc 14

40 <210> 5
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 5

50 gaaggtgtgc acg 13

<210> 6
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

60 <400> 6

ccacgtgct gag 13

65 <210> 7
<211> 14
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 5 <400> 7
 actttgcaca ccac 14
 10 <210> 8
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 8
 20 ttgttgccg ttgg 14
 <210> 9
 <211> 15
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 30 <400> 9
 gggaattctc acagg 15
 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 10
 40 gcgccctgaa aatacaggtt ttc 23
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 11
 55 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una biblioteca de levaduras mediante electroporación de células de levadura, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 incubar las células de levadura en una solución que comprende LiAc de 0,01 a 1,0 M y DTT de 1 a 100 mM, y proporcionar una suspensión que comprende ADN de vectores, ADN del inserto, las células de levadura, sorbitol de 0,1 a 10 M y CaCl₂ o MgCl₂ de 0,1 a 10 mM y
 - 10 electroporar la suspensión a 0,5 kV /cm a 12,5 kV/cm con una capacitancia de 10 a 50 µF.
2. El método de la reivindicación 1, donde la suspensión comprende sorbitol 1M y CaCl₂.1 mM.
3. El método de la reivindicación 1, donde la suspensión comprende sorbitol 1M y MgCl₂ 1 mM.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, donde las células de levadura se incuban en una solución que comprende LiAc 0,1 M y DTT 10 Mm.
5. El método de la reivindicación 1, donde la suspensión se somete a electroporación a 2,5 kV/cm con una capacitancia de 25 µF.
 - 20 6. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de electroporación se realiza en una cubeta con 0,2 cm de hueco.
 7. El método de la reivindicación 1, donde se usa de 1 µg a 8µg del ADN del vector.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, donde se usan 4 µg del ADN del vector.
9. El método de la reivindicación 1, donde el vector es lineal.
10. El método de la reivindicación 1, donde la suspensión comprende 400 µl of 1,6 x 10⁹ células de levadura/ml.
 - 30 11. El método de la reivindicación 1, donde la proporción entre el ADN del vector y el ADN del inserto está en el intervalo de 1:0,5 a 1:10.
 12. El método de la reivindicación 1, donde la proporción entre el ADN del vector y el ADN del inserto es de 1:3.
- 35 13. Un método para transformar levaduras con ADN para preparar una biblioteca de levaduras, comprendiendo el método las etapas de:
 - 40 [[C]] cultivar células de levadura a una DO₆₀₀ de 1,0 a 2;
 - [[L]] lavar las células de levadura en agua;
 - [[L]] lavar las células de levadura en una solución que comprende sorbitol y CaCl₂;
 - [[I]] incubar las células de levadura en una solución que comprende LiAc de 0,01 a 1,0 M y DTT de 1 a 100 mM;
 - [[L]] lavar las células de levadura en una solución que comprende sorbitol y CaCl₂;
 - 45 [[R]] resuspender las células de levadura en una solución que comprende sorbitol de 0,1 a 10 M y CaCl₂ o MgCl₂ de 0,1 a 10 mM para formar una suspensión de electroporación de las células de levadura.
 - [[A]] añadir un volumen de la suspensión de electroporación de las células de levadura al ADN del vector y al ADN del inserto para formar una suspensión de electroporación de células de levadura – ADN; y
 - [[E]] electroporación de la suspensión de electroporación de células de levadura – ADN a una tensión de entre 2,5 kV/cm and 12,5 kV/cm en una cubeta de hueco de 0,2 cm.
 - 50

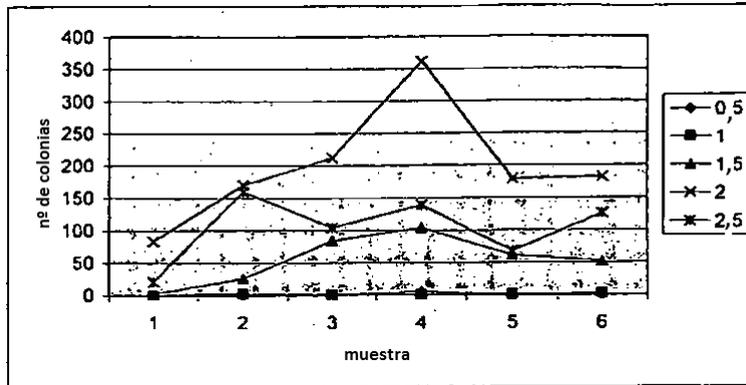


Figura 1

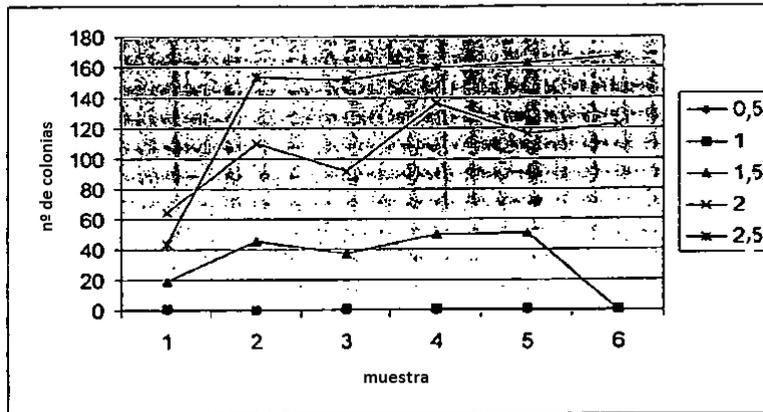


Figura 2

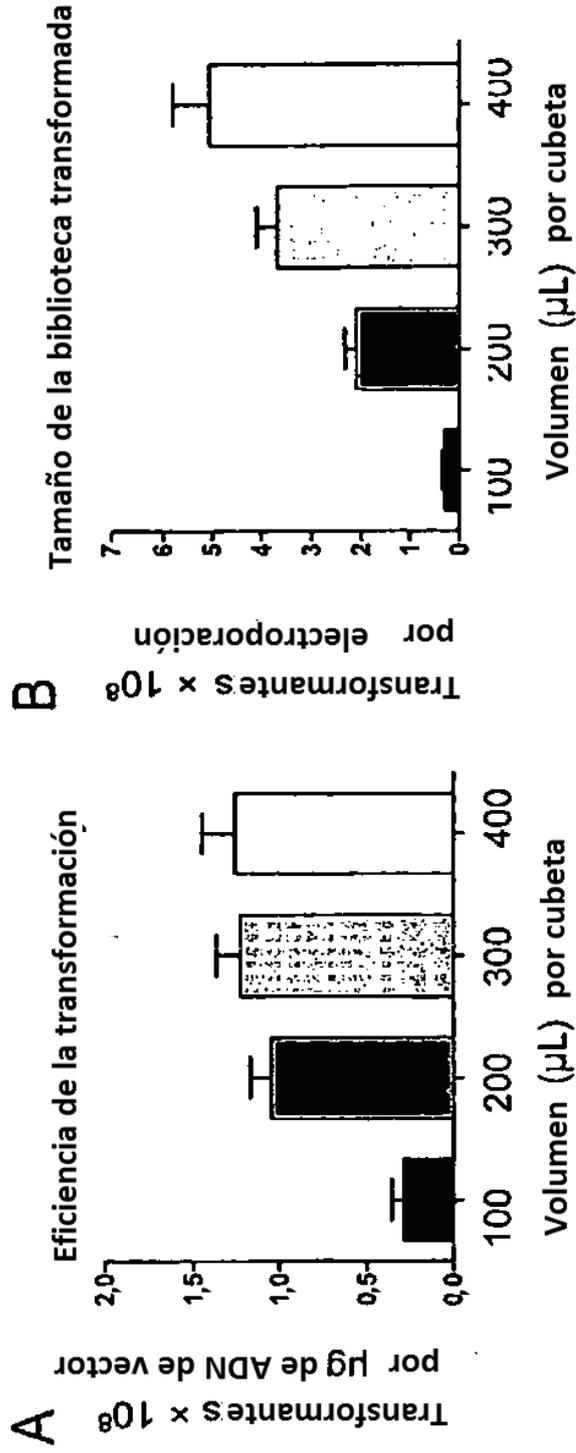


Figura 3

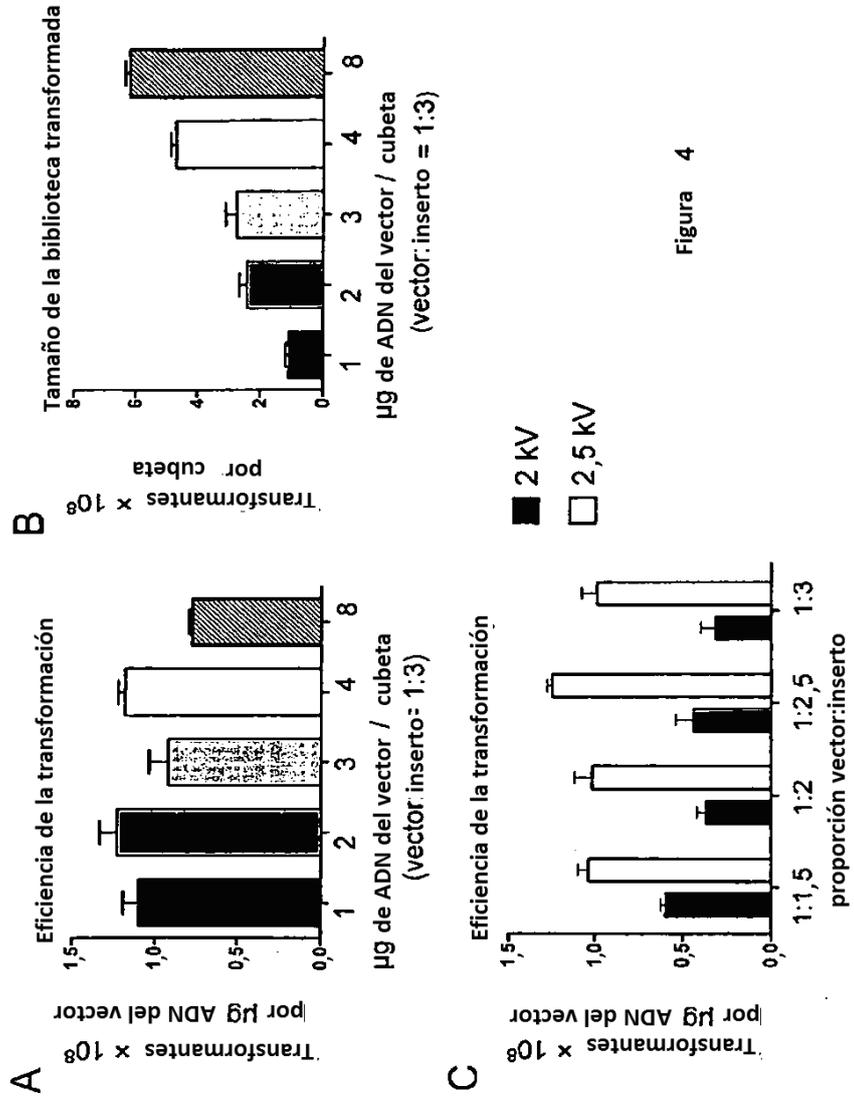


Figura 4