(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 609 313**

(51) Int. Cl.:

C40B 30/04 (2006.01)
C40B 40/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012** **PCT/AU2012/000761**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013** **WO13000023**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012** **E 12803679 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2726652**

(54) Título: **Método de expresión de proteínas**

(30) Prioridad:

29.06.2011 AU 2011902568

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2017

(73) Titular/es:

AFFINITY BIOSCIENCES PTY LTD (100.0%)
1 Dalmore Drive
Scoresby, VIC 3179, AU

(72) Inventor/es:

BEASLEY, MATTHEW y
KIEFEL, BEN

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 609 313 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

Método de expresión de proteínas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para cribar un polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo. En particular, la presente invención se refiere a métodos para cribar un polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo mediante la expresión del polipéptido en una célula bacteriana Gram negativa y la permeabilización de la célula bacteriana. La memoria descriptiva también se refiere a métodos de empaquetamiento de bibliotecas de genes en una célula bacteriana.

Antecedentes de la invención

El método más antiguo de expresión de proteínas es la expresión en fagos (Smith, 1985), en el que la proteína de interés se fusiona con una de las proteínas de recubrimiento externo del fago donde puede estar presente junto con las copias de tipo silvestre de la proteína. Por ejemplo, una plataforma de expresión basada en el fago filamentoso M13 usando fusiones con la proteína gIII.

Otros métodos de expresión incluyen métodos de expresión "*in vitro*" en los que la proteína se expresa utilizando un extracto de traducción celular y el acoplamiento entre la proteína y el ácido nucleico codificador se logra mediante enlace físico (por ejemplo, expresión en ribosomas, expresión de ARNm) o a través de unión con un andamiaje común o encapsulación dentro de una membrana, tal como compartimentación *in vitro* (IVC) en donde el ARNm se traduce dentro de una suspensión de micelas que puede también incluir un sistema de captura de microperlas (magnético o de Sefarosa) tanto para ARNm como para proteína.

Otro método de expresión de proteínas es la expresión en la superficie microbiana que involucra la localización dirigida de proteínas expresadas al exterior de una célula microbiana, ya sea eubacteria Gram negativa o Gram positiva o levadura. Las proteínas se fusionan con dominios de anclaje que las unen a la superficie de la célula. Los dominios de anclaje pueden tener motivos que dictan lipidación o unión covalente con la pared celular, o pueden ser una fusión con una proteína de la membrana entera dentro de una región bucle expuesta. Debido a la escalabilidad de la producción, la expresión en la superficie microbiana puede ser utilizada no solamente para cribado de las variantes de proteína mejoradas a partir de una biblioteca diversa, sino que también puede utilizarse para presentar antígenos para vacunación o como un andamiaje celular para enzimas de biotecnología industrial.

Los métodos de expresión de proteínas se aplican comúnmente a la evolución de proteínas de afinidad, tales como anticuerpos. Los métodos de expresión de moléculas individuales son históricamente los más populares, pero adolecen de alto nivel de ruido y baja resolución entre las escalas de afinidad. Los anticuerpos identificados mediante expresión *in vitro* o mediante sistemas de fagos son habitualmente reformados para su expresión en el periplasma de *E. coli*, aunque los rendimientos periplasmáticos son a menudo extremadamente pobres en comparación con la expresión en el citoplasma. Sin embargo, cuando los anticuerpos se expresan en el citoplasma con alto rendimiento, en casi todos los casos forman cuerpos de inclusión insolubles que deben ser replegados laboriosamente y sometidos a prueba de actividad.

Por lo tanto, subsiste la necesidad de métodos de expresión de proteínas, particularmente para el cribado de bibliotecas de expresión de proteínas de afinidad y bibliotecas de enzimas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores han desarrollado un método de expresión de proteínas en el que se produce un polipéptido que es cribado para una actividad deseada en el citoplasma de una célula bacteriana Gram negativa y el polinucleótido que codifica el polipéptido se empaqueta dentro de un fago de lisis defectuosa que también se retiene dentro de la célula bacteriana. Una o más de las membranas celulares bacterianas están permeabilizadas, por lo que la célula bacteriana puede ponerse en contacto con una molécula objetivo con el fin de detectar la actividad deseada. La presente invención proporciona el objetivo tal como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones anexas 1 a 15.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método de cribado de un polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo, comprendiendo el método:

a) cultivar una célula bacteriana Gram negativa que comprende un polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de manera que el polipéptido se produzca en la célula,

b) permitir que un fago de lisis defectuosa empaquete el polinucleótido que codifica el polipéptido, en el que el fago de lisis defectuosa se retiene dentro de la célula bacteriana,

c) permeabilización:

i) de la membrana externa de la célula bacteriana, o

ii) de las membranas interna y externa de la célula bacteriana,

d) poner en contacto la célula bacteriana con la molécula objetivo, y

e) cribar el polipéptido para la actividad deseada,

en donde se retiene el polipéptido dentro de la célula bacteriana por la pared celular bacteriana o membrana interna y/o el polipéptido se une a la pared de la célula bacteriana o a la membrana interna.

En una realización, el polipéptido puede ser expresado y retenido dentro del citoplasma de la célula bacteriana por la pared celular bacteriana. Por lo tanto, en una realización, el método comprende la permeabilización de las membranas interna y externa de la célula bacteriana.

El polipéptido puede tener un tamaño suficiente de tal manera que es retenido dentro de la célula bacteriana que comprende membranas internas y externas permeabilizadas por la pared celular intacta. Alternativamente, si el polipéptido es suficientemente pequeño en tamaño puede difundirse a través de la pared celular intacta. Con el fin de evitar que el polipéptido se difunda a través de la pared celular, en una realización el polipéptido se asocia con al menos un segundo polipéptido para formar un complejo proteico que es retenido dentro de la célula bacteriana permeabilizada y/o se une a la pared celular bacteriana. En una realización, el polipéptido se fusiona con el segundo polipéptido o una de sus subunidades.

En una realización particular, el segundo polipéptido se selecciona de:

i) un polipéptido que tiene un tamaño molecular tal manera que se retiene el complejo de proteína dentro de la pared celular bacteriana permeabilizada;

ii) una proteína de unión al ADN;

iii) una proteína de unión a la pared celular bacteriana; y/o

iv) una proteína de la cubierta del fago del fago de lisis defectuosa.

Aunque se puede utilizar cualquier método adecuado para permeabilizar las membranas bacterianas interna y externa, en una realización, las membranas bacterianas interna y externa son permeabilizadas con uno o más detergentes o un disolvente orgánico.

En una realización, uno o más detergentes son un detergente no iónico.

En otra realización, el detergente no iónico se selecciona de Decanoil-N-metilglucamida (Mega10), óxido de dimetiloctilfosfina (Apo8), n-octil-β-D-tioglucopiranosido (8TGP) y una mezcla de Decanoil-N-metilglucamida (Mega10) y óxido de dimetiloctilfosfina (Apo8).

Alternativamente, las membranas interna y externa de la célula bacteriana pueden ser permeabilizadas con un disolvente orgánico tal como cloroformo. Por ejemplo, en una realización, las membranas interna y externa de la célula bacteriana se permeabilizan incubando la célula bacteriana en una solución acuosa saturada con cloroformo.

En una realización particular, la célula bacteriana se incuba en la solución acuosa saturada con cloroformo durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 25ºC.

En otra realización de la invención, el polipéptido se produce en la célula bacteriana y se une a la membrana interna de la célula bacteriana. De este modo, la membrana externa de la célula bacteriana se permeabiliza y la pared celular se hidroliza al menos parcialmente, mientras que la membrana interna permanece intacta.

Por consiguiente, en una realización del método de la invención:

i) se permeabiliza la membrana externa de la bacteria;

ii) se hidroliza al menos parcialmente la pared celular bacteriana; y

iii) se une el polipéptido a la membrana interna.

En una realización particular, la pared celular bacteriana se hidroliza al menos parcialmente con lisozima.

En una realización adicional, el polipéptido se fusiona con una proteína que se une a la membrana interna. En una realización particular, el polipéptido está unido a la cara externa de la membrana interna.

En aún otra realización, el polipéptido está asociado con una proteína del recubrimiento del bacteriófago. En una realización particular, el polipéptido se fusiona a cualquiera de los extremos de la proteína de la cápside del bacteriófago lambda, gpD. En otra realización, el polipéptido se fusiona con al extremo del terminal N de la proteína de la cápside del bacteriófago P2, gpL.

El ADN que codifica el polipéptido puede ser ADN genómico y/o ADN episomal. En una realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido es un ADN de plásmido, de cósmido, de fagémido o de fago.

En una realización, el fago de lisis defectuosa es un fago templado seleccionado entre el fago lambda, 186, P2, un híbrido de 186 y P2 y/o P4.

El fago de lisis defectuosa puede estar presente en la célula bacteriana Gram negativa como un fago o integrado en el genoma de la célula huésped como un profago. Por tanto, en una realización, el fago de lisis defectuosa es un profago.

En una realización particular, la célula bacteriana comprende un fago lambda de lisis defectuosa, 186, P2, un híbrido de 186 y profago P2, y/o P4.

En otra realización, la célula bacteriana comprende un profago P2 y P4.

En una realización particular, la célula bacteriana comprende un profago lambda.

En aún otra realización, la célula bacteriana comprende un híbrido de 186 y un profago P2.

En una realización, permitir que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido que codifica el polipéptido comprende inducir la activación del profago en la célula bacteriana para producir el fago, donde el fago empaqueta el polinucleótido.

En una realización, la inducción de la activación del profago comprende producir una o más proteínas activadoras de fagos en la célula bacteriana.

En una realización particular, la célula bacteriana comprende los profagos P2 y P4 y el método comprende producir proteínas activadoras de P2 y/o P4 en la célula bacteriana.

En una realización, las proteínas activadoras de P2 y/o P4 se seleccionan de uno o más de P2 *cox*, P2 *ogr*, P4 δ y/o P4ε.

En otra realización, la inducción de la activación del profago comprende inactivar una o más proteínas represoras de fagos en la célula bacteriana.

En una realización, la célula bacteriana comprende al profago de P2 y/o P4 y la inducción de la activación del profago P2 comprende inactivar un alelo represor sensible a la temperatura de la proteína C de P2 en la célula bacteriana.

En una realización, la célula bacteriana comprende el profago lambda e inducción de la activación del profago lambda comprende la inactivación de un alelo represor sensible a la temperatura de la proteína cI represora del fago lambda en la célula bacteriana.

En otra realización, la célula bacteriana comprende al profago 186 y la inducción de la activación del profago 186, comprende la inactivación de un alelo represor sensible a la temperatura de la proteína cI de 186 en la célula bacteriana.

En otra realización, la célula bacteriana comprende un híbrido de profago 186 y P2 y la inducción de la activación del profago comprende la inactivación de un alelo represor sensible a la temperatura del fago híbrido en la célula bacteriana.

En otra realización adicional, el profago es de lisis defectuosa debido a la supresión o mutación a una forma inactiva de cualquiera de los genes de lisozima o de holina, o supresión o mutación a una forma inactiva tanto de los genes de

holina como de lisozima. En una realización particular, el gen de la lisozima del profago P2 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 17 y el gen de la holina P2 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 18. En otra realización, el gen de holina del profago lambda comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 23 y el gen de lisozima lambda comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 24.

En otra realización, la inducción de la activación del profago comprende el aumento de la temperatura de incubación de las células bacterianas. En una realización particular, la temperatura de incubación de las células bacterianas se incrementa desde aproximadamente 30ºC hasta aproximadamente 42ºC para inducir la activación del profago. En una realización, el profago es fago lambda. En otra realización, el profago es 186 o un híbrido de profago 186 y P2.

El experto en la técnica comprenderá que el método de la presente invención se puede usar junto con otros sistemas conocidos de expresión en fagos. En contraste con la presente invención, los sistemas conocidos de expresión en fagos no empacan el polinucleótido que codifica el polipéptido en un fago de lisis defectuosa y/o no retienen el polipéptido dentro de la célula bacteriana o se unen a la pared celular bacteriana o a las membranas celulares.

Por consiguiente, en una realización, el método comprende además una selección adicional del polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo en una célula bacteriana Gram negativa, en donde

i) el polinucleótido que codifica el polipéptido no se empaqueta en un fago de lisis defectuosa , y/o

ii) el polipéptido no está retenido dentro de la célula bacteriana por la pared celular bacteriana y/o unido a la pared celular bacteriana.

Aunque el cribado adicional utilizando un sistema conocido de expresión en fagos puede realizarse antes y/o después del método de la invención, en una realización el cribado adicional se lleva a cabo antes del método de la invención.

En una realización, el fago en el cribado adicional se lleva a cabo usando un fago lítico o un fago templado para empaquetar el polinucleótido que codifica el polipéptido.

En otra realización, la célula bacteriana en el cribado adicional es lisada para liberar el fago.

En aún otra realización, el fago en el cribado adicional es un fago lítico que lisa la célula bacteriana.

Cuando la célula bacteriana es lisada durante el cribado adicional, es deseable unir el polipéptido a la partícula del fago.

De este modo, en una realización:

i) el fago lítico comprende una primera pareja de unión en la capa del fago, y

ii) el polipéptido que esta siendo cribado para una actividad deseada es una proteína de fusión que comprende una segunda pareja de unión,

en donde la proteína de fusión que comprende la segunda pareja de unión se une a la primera pareja de unión en la capa del fago lambda.

En una realización, el fago lítico es fago lambda.

En otra realización, el fago lítico es 186, P2, un híbrido de 186 y un profago P2, y/o P4.

En una realización, la primera pareja de unión es calmodulina y la segunda pareja de unión es un péptido que se une a la calmodulina.

En aún otra realización, los uno o más profagos en el cribado adicional son fagos de lisis defectuosa y las células se lisan químicamente y/o enzimáticamente. En una realización particular, la lisis enzimática de las células comprende la lisis de las células bacterianas con lisozima. El fago de lisis defectuosa puede ser, por ejemplo, lambda, 186, P2, un híbrido de 186 y el profago P2, y/o P4 de lisis defectuosa.

Aunque el método de la invención puede ser usado para empaquetar cualquier biblioteca génica, en una realización, la biblioteca de polinucleótidos que codifica polipéptidos que van a ser cribados para una actividad deseada contra una molécula objetivo.

La memoria descriptiva proporciona además una bacteria Gram negativa que comprende un fago de lisis defectuosa con una proteína represora sensible a la temperatura.

La memoria descriptiva proporciona además una bacteria Gram negativa que comprende un fago de lisis defectuosa y un polinucleótido que codifica una o más proteínas activadoras de fagos.

El fago de lisis defectuosa se puede seleccionar a partir de lambda, 186, P2, un híbrido de 186 y P2 y/o P4.

Las proteínas activadoras de fagos se pueden seleccionar de P2 *cox*, P2 *ogr*, P4 δ y/o P4ε.

La memoria descriptiva proporciona además un kit que comprende la bacteria Gram negativa como se describe en la presente memoria.

El kit puede comprender además un agente capaz de permeabilizar la célula bacteriana Gram negativa. El agente capaz de permeabilizar la célula bacteriana Gram negativa se puede seleccionar de uno o más detergentes o un disolvente orgánico.

El detergente puede ser un detergente no iónico seleccionado de decanoil-N-metilglucamida (Mega10), óxido de dimetiloctilfosfina (Apo8), n-octil-β-D-tioglucopiranosido (8TGP), polisorbato 20 (Tween20) y un mezcla de decanoil-N-metilglucamida (Mega10) y óxido de dimetiloctilfosfina (Apo8).

El disolvente orgánico puede ser cloroformo.

La memoria descriptiva proporciona además un método para cribar un polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo, comprendiendo el método:

a) cultivar una célula bacteriana Gram negativa que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de tal manera que se produce el polipéptido,

b) permeabilizar las membranas interna y externa de la célula bacteriana con cloroformo, en donde el polipéptido y el polinucleótido que codifica el polipéptido se retienen dentro de la célula bacteriana permeabilizada,

c) poner en contacto la célula bacteriana permeabilizada con la molécula objetivo de tal manera que se difunda en la célula bacteriana permeabilizada y

d) cribar el polipéptido para la actividad deseada.

La memoria descriptiva proporciona además un método de cribado de un polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo, comprendiendo el método:

a) cultivar una célula bacteriana Gram negativa que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de tal manera que se produce el polipéptido y se une a la pared celular bacteriana,

b) permeabilizar las membranas interna y externa de la célula bacteriana con cloroformo, en donde el polinucleótido que codifica el polipéptido se retiene dentro de la célula bacteriana permeabilizada,

c) poner en contacto la célula bacteriana permeabilizada con la molécula objetivo, y

d) cribar el polipéptido para la actividad deseada.

La etapa d) puede comprender:

i) determinar si el polipéptido se une y/o el grado de unión con la molécula objetivo, y/o

ii) determinar si el polipéptido modifica enzimáticamente y/o la velocidad de modificación enzimática de la molécula objetivo.

El polipéptido puede estar asociado con al menos un segundo polipéptido para formar un complejo proteico que es retenido dentro de la célula bacteriana permeabilizada y/o unido a la pared celular bacteriana.

El polipéptido puede fusionarse con el segundo polipéptido, o una de sus subunidades.

En el método descrito en la presente memoria, el segundo polipéptido se puede seleccionar de:

i) un polipéptido que tiene un tamaño molecular de tal manera que el complejo de proteína se retiene dentro de la pared celular bacteriana permeabilizada;

ii) una proteína de unión al ADN;

iii) una proteína de unión a la pared celular bacteriana, y/o

iv) una proteína de recubrimiento del fago.

La memoria descriptiva proporciona además un método para identificar un polipéptido con una actividad deseada, comprendiendo el método:

a) cribar una biblioteca de polipéptidos usando un método como se describe en el presente documento; y

b) seleccionar uno o más polipéptidos con la actividad deseada.

La memoria descriptiva proporciona además una célula bacteriana Gram negativa obtenida mediante permeabilización de las membranas interna y externa de la célula bacteriana con cloroformo, en donde la célula bacteriana comprende un polipéptido exógeno asociado con un segundo polipéptido para formar un complejo proteico que se retiene dentro de la célula bacteriana permeabilizada.

La memoria descriptiva proporciona además una célula bacteriana Gram negativa obtenida por permeabilización de las membranas interna y externa de la célula bacteriana con cloroformo, en donde la célula bacteriana comprende un polipéptido exógeno unido a la pared celular bacteriana.

La memoria descriptiva proporciona además un kit que comprende:

a) un vector que comprende

i) un sitio para insertar en el vector un polinucleótido que codifica un primer polipéptido, y

ii) un marco de lectura abierto que codifica un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido para formar un complejo de proteína que se retiene dentro de la célula bacteriana Gram negativa permeabilizada, y

b) cloroformo para permeabilizar una célula bacteriana.

La memoria descriptiva proporciona además un kit que comprende:

a) un vector que comprende

i) un sitio para insertar dentro del vector un polinucleótido que codifica un primer polipéptido, y

ii) un marco de lectura abierto que codifica un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido para formar un complejo proteico que se une a una pared celular bacteriana Gram negativa, y

b) cloroformo para permeabilizar una célula bacteriana.

Como será evidente, los rasgos y características preferidas de un aspecto de la invención son aplicables a muchos otros aspectos de la invención.

A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprende", o variaciones tales como "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, un número entero o un etapa determinados, o un grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

La invención será descrita a continuación por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

FIGURA 1. Permeabilización con detergente de células de *E. coli* . Las células de *E. coli* que expresan GFP fueron tratadas con detergentes para determinar la eficacia de la permeabilización de la membrana. Las células fueron observadas ya sea por microscopía de campo claro (primera columna) o de fluorescencia (segunda y tercera columnas). La permeabilización fue efectiva si GFP (columna 2) fue liberaba de la célula al mismo tiempo con la absorción del colorante impermeable a la membrana que se une al ADN, Gel Red (tercera columna). Se encontró que los detergentes 8TGP (0,5%) y Mega10 al 0,5%/ Apo8 al 0,5% ('Agente86') fueron los más eficaces en la permeabilización de las células de *E. coli*.

FIGURA 2. SDS-PAGE de sobrenadantes de detergente. El sobrenadante de la permeabilización con detergente de las células de *E. coli* mostradas en la Figura 1 fueron cargadas en una SDS-PAGE al 9% para juzgar cualitativamente la liberación de proteína por los detergentes (primer carril). Para demostrar la retención de un subconjunto de proteínas celulares por la cápsula de la pared celular en células permeabilizadas con detergente, se trató una muestra de células permeabilizadas con detergente con lisozima (2 mg/mL) para hidrolizar la pared celular (segundo carril).

FIGURA 3. Expresión de la proteína de fusión tetramérica. (A) La expresión de las proteínas de fusión His6::SNAP:: tetrámero en *E. coli* se examinó mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo αHis probado contra la proteína celular total. Se observó una banda de alto peso molecular > 250 kD en la fusión del tetrámero RhnA (carril 4), además de una banda del peso molecular esperado, que es una forma presumiblemente resistente a SDS del complejo que migró como un tetrámero. (B) El extracto de proteína de fusión tetramérica BetB se separó en los extractos soluble en detergente e insoluble en detergente (sedimento de la cápsula celular), y se examinó mediante SDS-PAGE.

FIGURA 4. Marcación con SNAP de las proteínas de fusión tetraméricas. Las proteínas de fusión His6::SNAP::tetrámero se expresaron en *E. coli* y se permeabilizaron las células con 8TGP, como se describe en el Ejemplo 1. La expresión de la proteína de fusión se detectó mediante microscopía de fluorescencia de las células permeabilizadas marcadas con el ligando BG-547 de SNAP impermeable a la membrana (segunda columna), como se describe en el Ejemplo 3. Se marcó el ADN celular con el colorante permeable a la membrana, Sytox Green (primera columna). La superposición de la señal de SNAP y Sytox Green se presenta en la tercera columna.

FIGURA 5. Marcación con el anticuerpo αHis del tetrámero His6::SNAP::BetB en células permeabilizadas. Microscopía de fluorescencia de células permeabilizadas que expresan el tetrámero His6::SNAP::BetB probado con un anticuerpo αHis (primer panel), como se describe en el Ejemplo 3. Las células fueron marcadas con el ligando BG-547 de SNAP(segundo panel). La localización conjunta tanto de αHis como de SNAP (tercer panel) indica que el anticuerpo αHis penetró a través de la pared celular de las células permeabilizadas.

FIGURA 6. Fusiones de los tetrámeros BetB, RhnA y YdcW con reporteros de expresión HALO y SNAP. Los tetrámeros BetB, RhnA y YdcW se fusionaron en forma separada con los reporteros de expresión, HALO y SNAP. Las células que expresan la proteína de fusión fueron permeabilizadas y se marcó el ADN del huésped con Gel Red y se detectó la proteína de fusión usando los ligandos fluorescentes para HALO (G1001) y SNAP (BG-488).

FIGURA 7. Expresión de la fusión GFP5::Proteína de unión a ADN(DBP). Se fusionó la proteína de unión a ADN de alta afinidad, no específica, ComE, de *N. gonorrea* al extremo terminal C de GFP5 y se expresó en *E. coli.* Las células se permeabilizaron y se observaron por microscopía de fluorescencia para GFP (primer panel) y Gel Red (segundo panel). La localización conjunta(tercer panel) de la fluorescencia indica que tanto la proteína de fusión como el ADN del huésped fueron retenidos dentro de la cápsula celular permeabilizada.

FIGURA 8. Retención de ADN en células permeabilizadas. Las células de *E. coli* que expresan la fusión GFP5::DBP o una fusión His6::eGFP fueron o bien dejadas sin tratamiento (filas 1 y 4) o fueron permeabilizadas (filas 2, 3, 5 y 6) como se describe en el Ejemplo 1. Las células permeabilizadas fueron o bien almacenadas durante la noche a 4ºC o resuspendidas en TBS y agitadas durante la noche a 37ºC antes de ser observadas por microscopía de fluorescencia para GFP (primera columna) o Gel Red (segunda columna). La localización conjunta de GFP y Gel Red se presenta en la tercera columna.

FIGURA 9. Extracción de ADN de células permeabilizadas. Las células de *E. c*oli que expresan (A) las proteínas de fusión GFP5::DBP o (B) His6::eGFP fueron permeabilizadas como se describe en el Ejemplo 1. Las células permeabilizadas se almacenaron durante la noche a 4ºC o se resuspendieron en TBS y se agitaron durante la noche a 37ºC antes de que fuera extraído el ADN plasmídico y se sometiera a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% con regulador TAE y teñido con bromuro de etidio. El carril 1 es el ADN plasmídico total en células no tratadas. Los carriles 2 y 4 son los sobrenadantes de la etapa de permeabilización de las cápsulas celulares almacenadas durante la noche a 4ºC y con agitación a 37ºC, respectivamente, y los carriles 3 y 5 son preparaciones de plásmido de las cápsulas celulares almacenadas durante la noche a 4ºC y con agitación a 37ºC, respectivamente.

FIGURA 10. Marcación con SNAP de la proteína de fusión OmpF::SNAP::LPP. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión OmpF::SNAP::LPP se permeabilizaron como se describe en el Ejemplo 1. La localización de la proteína de fusión se detectó mediante marcación con el ligando BAG-488 de SNAP como se describe en el Ejemplo 3.

Las células marcadas se observaron mediante microscopía de campo claro (primer panel) y por microscopía de fluorescencia (segundo panel). El tercer panel es la superposición de las observaciones de campo claro y de fluorescencia.

FIGURA 11. Unión de eGFP por proteína de fusión αGFP::HALO::RhnA. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión αGFP::HALO::RhnA se permeabilizaron como se describe en el Ejemplo 1. La proteína eGFP purificada se unió a las cápsulas celulares como se describe en el Ejemplo 8 y se observó eGFP por microscopía de fluorescencia. Primer panel, observación por campo claro; segundo panel, fluorescencia con eGFP; tercer panel, superposición de la observación por campo claro y fluorescencia.

FIGURA 12. Unión de eGFP por la proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP se permeabilizaron como se describe en el Ejemplo 1. La proteína eGFP purificada se unió a las cápsulas celulares como se describe en el Ejemplo 8 y se observó la eGFP por microscopía de fluorescencia mediante dos métodos, montaje en húmedo y montaje en seco, como se describe en el Ejemplo 3. (A) eGFP unida a cápsulas de células montadas en húmedo. Los paneles de inserción (i) y (ii) muestran la localización en la pared celular de la eGFP unida por la proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP. (B) y el panel de inserto (Aiii) muestran las mismas células preparadas para microscopía por montaje en seco en DABCO/glicerol.

FIGURA 13. Unión de eGFP por la proteína de fusión OmpF::αGFP::SNAP::LPP. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión OmpF::SNAP::LPP o la proteína de fusión OmpF::αGFP::SNAP::LPP se permeabilizaron como se describe en el Ejemplo 1. La proteína eGFP purificada se unió a las cápsulas celulares como se describe en el Ejemplo 8 y eGFP se observó mediante microscopía de fluorescencia por montaje en seco, como se describe en el Ejemplo 3. (A) Las células que expresan la proteína de fusión OmpF::SNAP::LPP carecen de fluorescencia de eGFP (segundo panel, fila superior), a diferencia de las células que expresan la proteína de fusión OmpF::αGFP::SNAP::LPP (segundo panel, fila inferior).

FIGURA 14. Demostración de la unión covalente a la pared celular mediante la proteína de fusión LPP. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión OmpF::αGFP::SNAP::LPP se permeabilizaron como se describe en el Ejemplo 1. La localización de la proteína de fusión se detectó mediante la marcación con el ligando BG-488 de SNAP como se describe en el Ejemplo 3 y se tiñó el ADN con Gel Red. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 22°C (A) o a 95°C (B) antes de ser montadas en seco y observadas por microscopía de fluorescencia.

FIGURA 15. Permeabilización de la membrana externa utilizando un regulador detergente/Ca^{2+}. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión OmpF::αGFP::SNAP::LPP (αGFP externa o la proteína de fusión αGFP::HALO::FLAG::RhnA (αGFP interna) se permeabilizaron como se describe en el Ejemplo 10. La permeabilización de la membrana externa a los ligandos grandes se evaluó mediante la unión de eGFP al dominio de αGFP unido a la pared celular. La permeabilización de la membrana interna se evaluó utilizando un ligando grande (eGFP) y un ligando pequeño (Gel Red). Ambos detergentes Apo8 (A) y Tween20 (B) en regulador de Ca^{2+} demostró permeabilidad selectiva de la membrana externa a ligandos grandes.

FIGURA 16. Permeabilización de la membrana externa utilizando un regulador detergente/EDTA. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión OmpF::αGFP::SNAP::LPP (αGFP externa) o la proteína de fusión αGFP::HALO::FLAG::RhnA (αGFP interna) se permeabilizaron como se describe en el Ejemplo 10. La permeabilización de la membrana externa con ligandos grandes se evaluó mediante la unión de eGFP al dominio de αGFP unido a la pared celular. La permeabilización de la membrana interna se evaluó utilizando un ligando grande (eGFP) y un ligando pequeño (Gel Red). Ambos detergentes Apo8 (A) y Tween20 (B) en regulador de EDTA demostraron permeabilidad selectiva de la membrana externa a ligandos grandes.

Figura 17. Análisis por FACS de una población mixta de células marcadas con eGFP y SNAP. Tres poblaciones de células de *E. coli* que expresan; EGFP (flecha # 1); la proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP marcada con el ligando BG-488 de SNAP (flecha # 2); y His6::SNAP::BetB marcado con ligando BG-547 de SNAP (flecha # 3) fueron clasificados por FACS. Las poblaciones clasificadas se analizaron nuevamente con respecto a la pureza y la integridad de las células 60 minutos después de la primera clasificación.

Figura 18. Un enlazador peptídico entre los dominios αGFP y KzPG permite la unión de las células de *E. coli* que expresan una proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP con un soporte de sefarosa. Las células que expresan una proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP con una región enlazadora de 12-mer, RL6, entre los dominios de αGFP y KzPG se unieron a un soporte de Co^{2+}-sefarosa a través de un compuesto intermedio His6::eGFP. La unión de GFP se muestra en el panel izquierdo (verde); la unión del ligando de SNAP (rojo) de la proteína de fusión se muestra en el panel central; la superposición de cada uno se muestra a la derecha.

FIGURA 19. Unión de células de *E. coli* que expresan la proteína de fusión αGFP::RL6::KzPG::SNAP::DBP a perlas magnéticas marcadas con estreptavidina. (A) eGFP marcada con biotina (paneles central y derecho) se unió a las células que expresan la proteína de fusión αGFP::RL6::KzPG::SNAP::DBP que a su vez se unió a partículas magnéticas

marcadas con estreptavidina. (B) La unión inversa de las células que expresan la proteína de fusión αGFP::RL6::KzPG::SNAP::DBP a partículas magnéticas marcadas con estreptavidina que habían sido primero marcadas con eGFP biotinilado. En este ejemplo, las perlas están marcadas en verde (panel GFP), las células fueron marcadas con el ligando BG-547 de SNAP (rojo, panel rojo de SNAP). (C) Un enlazador de dominio, el dominio 27 de Ig de titina humana, también fue eficaz como un espaciador de unión. Las células de *E. Coli* que expresan la proteína de fusión αGFP::I27::RL6::KzPG::SNAP::DBP se unieron primero a eGFP biotinilado (verde, panel GFP) y se marcaron con el ligando BG-547 de SNAP (rojo, panel SNAP rojo) antes de unirse a las partículas magnéticas marcadas con estreptavidina.

Figura 20. Expresión de los genes scFv de ratón en el citoplasma de *E. coli* como proteínas de fusión scFv::I27::RL6::KzPG::SNAP::DBP. Se construyó y expresó una biblioteca de scFv de ratón de acuerdo con una realización del método de la invención en citoplasma de *E. coli*. Los clones con expresión detectable se detectaron mediante unión del ligando de SNAP y se categorizaron como plegados erróneamente (panel izquierdo), expresados débilmente pero solubles (panel del medio) o altamente expresados y solubles (panel derecho).

Figura 21. Detección de la expresión de scFv soluble e insoluble en el citoplasma de *E. coli*. Los clones seleccionados que se encontró que eran altamente expresados y solubles en una criba limitada de la biblioteca de la biblioteca de expresión de scFv de ratón se subclonaron en constructos de expresión como las proteínas de fusión scFv::I27::RL6::FLAG y scFv::RL6::FLAG. Las fracciones de proteína se cargaron como solubles o insolubles en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron usando anticuerpos αFLAG. Las muestras se emparejan por fracciones solubles (S) o insolubles (P), así como cada clon se expresa con el enlazador I27::RL6 (I) o RL6 (R). También se muestra en los paneles inferiores una imagen de microscopía de fluorescencia del clon scFv original en constructo de expresión I27::RL6::KzPG::SNAP::DBP aislado del cribado de la biblioteca.

FIGURA 22. Permeabilización de membranas con *E. coli* usando disolventes orgánicos. Las células de *E. coli* que expresan una proteína de fusión αGFP::RL6::KzPG::SNAP::DBP se suspendieron en mezclas acuosas de disolventes orgánicos. La permeabilización de la membrana se indicó mediante la unión de (A) un ligando fluorescente de unión a ADN de pequeño peso molecular, Gel Red; y de una proteína de 30 kD, eGFP. De los disolventes orgánicos probados, sólo el cloroformo permeabilizó membranas tanto internas como externas para permitir la entrada en la célula de la eGFP de alto peso molecular (B).

FIGURA 23. Expresión de la proteína de fusión αGFP:I27:gpL en *E. coli.* La expresión de la proteína de fusión αGFP:I27: gpL se indujo por inducción de arabinosa, como se describe en el Ejemplo 20. La proteína soluble se liberó de células de *E. coli* por permeabilización con 8TGP al 0,5% y el resto de la muestra se consideró insoluble. Las muestras se sometieron a ebullición en regulador de carga SDS y a electroforesis en SDS-PAGE al 15%. Se transfirieron las proteínas a la membrana de nitrocelulosa y se probaron con anticuerpo monoclonal αFLAG para detectar la proteína de fusión αGFP:I27:gpL. (1) muestra 1: clon de fusión 1 no inducido de αGFP:I27:gpL; (2) clon de fusión 1 inducido αGFP:I27:gpL 1; (3) clon de fusión 2 inducido αGFP:I27:gpL. S = fracción soluble; In = fracción insoluble.

FIGURA 24. Formación de imágenes de fluorescencia del fago lambda encapsulado marcado con mAG1 que expresa la proteína de fusión gpD::α-mAG1. Las células de *E. Coli* inducidas por un profago lambda y que expresan la proteína de fusión gpD::α-mAG1 fueron permeabilizadas y teñidas con la proteína mAG1 y el colorante de unión al ADN, Gel Red. mAG1 se observó mediante microscopía de fluorescencia para unirse en un patrón punteado dentro de células permeabilizadas (panel izquierdo).

FIGURA 25. Captura de pantalla del análisis por FACS de la afluencia del fago lambda encapsulado que expresa la proteína de fusión gpD::α-mAG1. Se muestra el gráfico de fluorescencia para eventos de 100 K en un FACS de afluencia (BD Biosciences) con una entrada de ~ 1% de células positivas para α-mAG1. La población de células ha sido teñida conjuntamente con el colorante de unión al ADN, Gel Red (rojo, 561 nm) y la proteína mAG1 fluorescente (verde, 488 nm). La población cerrada P2 es positiva para α-mAG1 y la población cerrada P3 es negativa para α-mAG1.

Clave del listado de la secuencias

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de nucleótidos del vector de arabinosa pAra3::His6::SNAP

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de nucleótidos del vector pAra3::His6::KzPG::SNAP::DBP

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de nucleótidos del vector pAra3::OmpF::SNAP::LPP

SEQ ID NO: 4 - Secuencia de nucleótidos del vector pAra3::αGFP(R35)::HALO::FLAG::RhnA

SEQ ID NO: 5 - Dominio espaciador peptídico aleatorizado

SEQ ID NO: 6 a 12 - Espaciadores enlazadores peptídicos

SEC ID NO: 13 - I27::RL6::KzPG::SNAP::DBP

SEC ID Neo: 14 - Secuencia de codificación de I27::RL6::KzPG::SNAP::DBP

SEQ ID NO: 15 - Vector de andamiaje de biblioteca

SEQ ID NO: 16 - Espaciador I27

SEQ ID NO: 17 - Secuencia de nucleótidos del gen de la endolisina del enterobacteriófago P2

SEQ ID NO: 18 - Secuencia de nucleótidos del gen de la holina del enterobacteriófago P2

SEQ ID NO: 19 - Secuencia de nucleótidos del vector P4 δ inducible por temperatura

SEQ ID NO: 20 - Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión αGFP::I27::gpL

SEQ ID NO: 21 - Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión gpL::αGFP::I27

SEQ ID NO: 22 - Secuencia de nucleótidos del vector de expresión de la proteína de fusión αGFP::I27::gpL

SEQ ID NO: 23 - Secuencia de nucleótidos del gen de holina del fago lambda

SEQ ID NO: 24 - Secuencia de nucleótidos del gen de lisozima del fago lambda

SEQ ID NO: 25 - Secuencia de aminoácidos del residuo de supresión de la agrupación de lisis lambda

SEQ ID NO: 26 - Secuencia de nucleótidos de la región lambda *cos*

SEQ ID NO: 27 - Secuencia de nucleótidos del vector de supresión de lambda SR (ΔSR)

Descripción detallada

Técnicas generales y definiciones

A menos que se defina específicamente lo contrario, se entenderá que todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica (por ejemplo, en química de proteínas, bioquímica, cultivo de células, genética molecular, microbiología, e inmunología).

A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y explican en la literatura en fuentes tales como J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), R. Scopes, Protein Purification - Principals and Practice, 3ra edición, Springer (1994), TA Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel y colaboradores (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha), Ed Harlow y David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988) y J.*E.* Coligan y colaboradores (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha).

Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" se usan generalmente indistintamente en la presente memoria descriptiva. Como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido exógeno" se refiere a un polipéptido codificado por un polinucleótido exógeno. El término "polinucleótido exógeno" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polinucleótido que es foráneo a la célula en la que ha sido introducido, o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula en la que se introduce pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en el que no se encuentra normalmente el polinucleótido.

El término "anticuerpo", tal como se usa aquí, incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, multicuerpos, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos quiméricos incluyendo

moléculas intactas, así como sus fragmentos, tales como Fab, $F(ab')_2$, Fv y scFv y otras moléculas similares a anticuerpos.

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un intervalo de +/- 5% del valor especificado.

Fago de lisis defectuosa

En una realización de la invención, se criba un polipéptido para una actividad deseada en una célula bacteriana Gram negativa, en donde el polipéptido se produce en la célula y el polinucleótido que codifica el polipéptido se empaqueta en un fago de lisis defectuosa. Por "fago de lisis defectuosa" se entiende un fago lítico o templado que normalmente tendría una etapa lítica en su ciclo de vida pero que se ha modificado de modo que, aunque pueda ejecutar todas las otras funciones de un ciclo lítico, es incapaz de lisis de una célula bacteriana Gram negativa para liberar el fago empaquetado. Por lo tanto, el fago de lisis defectuosa incluye fagos templados que son capaces de tener un ciclo lisogénico en el que el genoma viral se integra en el ADN de la célula huésped como un profago o se replica como un plásmido (fagémido). El profago permanece latente en la célula bacteriana hasta que las condiciones de la célula huésped permitan que el profago se active e inicie el ciclo reproductivo. Mientras que la iniciación del ciclo de reproducción de un profago resultaría normalmente en la lisis de la célula huésped bacteriana, el fago de lisis defectuosa en el método de la presente invención se ha modificado para que la célula huésped bacteriana no se lise y el fago permanezca dentro de la célula bacteriana.

El término "fago de lisis defectuosa" tal como se usa en la presente memoria descriptiva no incluye referencia a un fago que normalmente no tiene una etapa lítica en su ciclo de vida, por lo que el experto entenderá que no incluye referencia a fagos que se liberan a partir de una célula bacteriana por extrusión, por ejemplo fago filamentoso tal como M13, f1 o f2, o que son liberados de una célula bacteriana por germinación.

Ejemplos de fagos líticos que pueden modificarse para eliminar la etapa lítica de su ciclo de vida para producir un fago de lisis defectuosa incluyen los al bacteriófagos phiX174, T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7. Ejemplos de fagos lisogénicos que pueden modificarse para eliminar la etapa lítica de su ciclo de vida incluyen fago lambda, al fago N15, al fago P22, al fago Mu, al fago P2, al fago 186 y al fago satélite de P2, P4 (Lindqvist y colaboradores, 1993; Ziermann y colaboradores, 1994, Liu y colaboradores, 1997, y Briani y colaboradores, 2001).

El experto en la técnica comprenderá que algunos fagos templados que son capaces de empaquetar un polinucleótido en una célula bacteriana requieren la presencia de otro fago, por ejemplo, un fago auxiliar, con el fin de que experimente el empaquetamiento del polinucleótido y/o para que ocurra la lisis de célula bacteriana. Un ejemplo de esta relación es el fago P2 y su fago satélite, P4. El requisito para la presencia de un fago auxiliar para el empaquetamiento del polinucleótido y/o para la lisis de la célula bacteriana se conoce como sistema de fago auxiliar. En un sistema de fago auxiliar, la actividad de un fago auxiliar, o de polipéptidos de fagos (es decir, "proteínas activadoras"), induce a otro fago a que experimente empaquetamiento del polinucleótido y/o provoque la lisis de la célula bacteriana. Por lo tanto, el experto en la materia comprenderá que mientras que un polinucleótido puede ser empaquetado en un fago (es decir, un fago en un sistema de fago auxiliar), se puede requerir de la actividad de otro fago (es decir, un fago auxiliar) para lisar la célula bacteriana en la que están presentes ambos fagos. Para uso en algunas realizaciones del método de la presente invención, se modifica el fago que normalmente proporcionaría la actividad lítica de manera que ya no sea capaz de lisar una célula bacteriana. Por lo tanto, el término "fago de lisis defectuosa", tal como se usa en la presente memoria, también se refiere a un fago dentro del cual se empaqueta un polinucleótido, en donde el fago normalmente dependería en un segundo fago para proporcionar la actividad lítica, pero en donde el segundo fago ha sido modificado de manera que ya no sea capaz de lisar una célula bacteriana Gram negativa.

El experto en la técnica se dará cuenta que el polinucleótido también puede estar físicamente separado del genoma del fago de lisis defectuosa. Por ejemplo, el polinucleótido puede estar operativamente enlazado a secuencias que son suficientes para empaquetamiento del polinucleótido por las proteínas estructurales y replicativas del fago para formar una unidad infecciosa que se parezca morfológicamente, o sea idéntica a, la cepa progenitora del fago de lisis defectuosa.

Como ejemplo no limitante, los vectores plasmídicos del tamaño apropiado pueden contener la secuencia alrededor de la región *cos* requerida para el empaquetamiento del ADN en el bacteriófago lambda. Estos vectores plasmídicos pueden ser empaquetados *in vivo* por un fago auxiliar y también pueden ser empaquetados *in vitro* mediante extractos purificados que contienen las proteínas estructurales y replicativas del fago. Se proporciona una secuencia suficiente para empaquetamiento de lambda como la SEQ ID NO: 26. Estos vectores se conocen como cósmidos (*cos* + plásmido) y son bien conocidos por el experto en la técnica por su capacidad para clonar polinucleótidos exógenos y propagarlos como partículas de bacteriófagos. En la técnica se conocen kits comerciales para clonar polinucleótidos dentro de cósmidos, y kits para empaquetamiento *in vitro*.

Ejemplo de un sistema de fago auxiliar: el sistema P2-P4

Un ejemplo no limitante de un sistema de fago auxiliar es el sistema del fago P2-P4. Aunque cada fago porta los genes necesarios para garantizar su propia replicación e integración del ADN en el genoma del huésped, el fago P4 de *E. coli* carece de la información genética necesaria para las funciones de cola y lisis, así como de la proteína estructural principal para la formación de la cápside (Kahn y colaboradores, 1991; Liu y colaboradores, 1997). Por lo tanto, P4 depende del fago P2, o de un fago relacionado con P2, tal como el fago 186, con el fin de hacer que los componentes estructurales del fago P4, empaqueten su ADN y lisen la célula huésped. Cuando P4 infecta una célula huésped lisogénica de P2 (por ejemplo, *E. coli* que comprende un profago de P2 en su genoma), el profago de P2 es desreprimido por el gen ε de P4. La desrepresión produce como resultado una expresión génica temprana y tardía de P2 y es suficiente para completar el ciclo lítico de P4.

P4 también puede ser empaquetado por el fago similar a P2, el fago 186. Este fago tiene proteínas estructurales ortólogas a P2 (~75% de identidad) y se han construido fagos híbridos P2/186 que contienen los genes estructurales de P2 que son regulados por los factores de transcripción del fago 186 (Younghusband y colaboradores, 1975). Crucialmente, la región temprana del fago 186 y de los híbridos P2/186 (Hy2 y Hy5) no está relacionada con P2 y, por lo tanto, no está inhibida por la proteína de P4ε. Sin embargo, se puede usar un fago 186 como fago auxiliar de P4 si se usa el mutante sensible a la temperatura del represor de inmunidad del fago 186 para inducir las funciones del fago 186 para que coincidan con la infección por P4 (Sauer y colaboradores, 1982) o activación.

El experto comprenderá que un sistema bacteriófago P2/P4 será adecuado para su uso en el método de la presente invención. Las características ventajosas de un sistema bacteriófago P2 / P4 incluyen:

i) la preferencia de la enzima P2 terminasa para moldes de plásmido, a diferencia de otras terminasas de bacteriófagos que prefieren empaquetar moldes de polinucleótidos lineales concatemerizados. Por lo tanto, este sistema es más adecuado para el empaquetamiento *in vivo* de plásmidos que codifican al polipéptido que es cribado para una actividad deseada, y

ii) un cósmido (es decir, un plásmido que comprende una secuencia cos del bacteriófago que dicta el empaquetamiento del bacteriófagos) que puede ser empaquetado eficientemente en una cápside del tamaño de P4 (aproximadamente 10-12 kb) es más susceptible a métodos de clonación rutinarios y mutagénesis iterativa que los genomas de bacteriófagos más grandes, tal como lambda (48,5 kb).

Modificación genética para producir un fago de lisis defectuosa

El ciclo de vida del bacteriófago lítico implica tanto replicación como empaquetamiento del genoma como una partícula de fago, pero también la lisis celular para liberación de las partículas para nueva infección. La lisis celular de bacterias Gram negativas es un proceso de dos etapas, donde se perfora primero la membrana interna, permitiendo que una enzima que degrada la pared celular (una lisozima) acceda al espacio periplasmático y actúe sobre la pared celular del peptidoglicano. La célula se lisa por la diferencia en la presión osmótica entre el citoplasma y la solución circundante, liberando por lo tanto las partículas de fago en el medio.

Las actividades de perforación de la membrana (holina) y de lisozima son usualmente codificadas por dos genes en la mayor parte de los fagos líticos y lisogénicos. Debido a la parsimonia de la mayoría de los genomas de fagos, estos genes son a menudo vecinos en el mismo operón. Para retener la integridad de la pared celular y para evitar la liberación de partículas de fago y proteínas que están siendo funcionalmente cribadas por un método de la invención, el gen que codifica la lisozima del fago, o tanto a la lisozima como la holina, deben ser suprimidas del genoma del fago. Debido al uso frecuente de marcos de lectura superpuestos y codones de detención/inicio que conducen al acoplamiento de traducción en muchos genes de fagos, los efectos sobre el(los) gen(es) secuencia abajo deben ser cuidadosamente considerados cuando se diseñan estas supresiones. Si la agrupación se acopla a la traducción a genes estructurales secuencia abajo, entonces preferiblemente la supresión dejaría un ORF truncado como la "cicatriz" residual en el *locus* que tiene la región de inicio de un gen y la región de detención del otro.

En una realización, el método de cribado de proteínas de la invención utiliza la permeabilización de las membranas tanto interna como externa de la bacteria Gram negativa, mientras que retiene la integridad estructural de la pared celular de peptidoglicano. Por tanto, en esta realización, los genes de holina pueden mantenerse funcionales en el genoma del bacteriófago y pueden ayudar a contribuir a la permeabilización de la membrana interna, mientras que el gen de la lisozima se suprime para retener la integridad estructural de la pared celular. En el caso de que el fago de lisis defectuosa se utilice en un sistema de cribado que está acoplado a una proteína de orientación periplasmática, tal como se describe en los documentos WO 2002/034886 y WO 2005/095988, o a proteínas de fusión de unión a la pared celular, entonces las funciones de holina o holina/lisozima deben ser suprimidas del genoma del fago con el fin de retener la integridad de la membrana interna de la célula o del esferoplasto.

El experto en la técnica comprenderá que las funciones del gen de la lisina y/o de la lisozima pueden suprimirse suprimiendo el gen que codifica las moléculas del genoma del fago, o alternativamente mediante la mutación de los

genes de lisina y/o lisozima de manera que sean defectuosos y ya no codifiquen una lisina funcional y/o la proteína lisozima.

En las realizaciones de la invención que utilizan el sistema de satélite P2 y P4, el genoma de P2 contiene tanto los genes de holina (*Y*) como de lisozima (*K*) usados por P4. Por lo tanto, un profago P2 puede ser modificado por supresión de los genes *K*, *Y* o *YK*. La construcción de un fago P2 de lisis defectuosa se describe en el Ejemplo 16 con la supresión de los genes *YK* del genoma de un profago P2 de una cepa K12 de *E. coli*. El profago P2Δ*YK* que porta un cósmido del tamaño de P4 puede ser infectado por un bacteriófago P4 induciendo así el empaquetamiento del cósmido. El cósmido también puede ser inducido para la expresión del gen que es cribado funcionalmente. Al final de la inducción tanto del empaquetamiento del cósmido como de la expresión del gen, las membranas celulares pueden ser permeabilizadas y la cápside celular cribada por el método de la invención. El empaquetamiento de un cósmido por un fago P2 de lisis defectuosa en una cepa de *E. coli* se describe en el Ejemplo 18 utilizando la infección de una cepa que porta el profago P2Δ*YK* mediante un fago P4.

En las realizaciones de la invención que utilizan el sistema de fagos lambda, los genes S y R lambda codifican la holina y la endolisina (lisozima), respectivamente. La supresión o inactivación mutacional de los genes *R* o *SR* produciría un profago lambda de lisis defectuosa.

La construcción de un fago lambda de lisis defectuosa se describe en el Ejemplo 20 con la supresión de los genes *SR* del genoma de un profago lambda de una cepa K12 de *E. coli.* El empaquetamiento de un cósmido por un fago lambda de lisis defectuosa en una cepa de *E. Coli* se describe en el Ejemplo 21 mediante la inducción a través de la inactivación del represor cI termolábil.

En realizaciones de la invención que utilizan un fago lítico, usando el fago T7 como ejemplo, puede producirse un fago de lisis defectuosa por inactivación mutacional del gen 3.5 que codifica la lisozima T7. Dado que la lisozima T7 tiene una actividad reguladora sobre la transcripción de T7 a través de su interacción inhibidora con RNAP de T7, la supresión de la lisozima sería desaconsejable. Por lo tanto, se requieren mutantes que inactiven específicamente la actividad amidasa de la pared celular de la enzima para crear mutantes de lisis defectuosa que retienen la replicación de T7.

Los sistemas de lisina/holina de otros fagos líticos o lisogénicos pueden identificarse mediante comparación con genomas de fagos conocidos, o mediante análisis genético, y pueden crearse mutantes de lisis defectuosa correspondientes para su uso en bibliotecas de empaquetamiento en los métodos de la presente invención.

Empaquetamiento de polinucleótido mediante fago de lisis defectuosa

En los métodos de cribado de la invención que utilizan un fago de lisis defectuosa, el método comprende el cultivo de una célula Gram negativa que comprende un polinucleótido exógeno que codifica al polipéptido que es cribado de tal manera que se produce el polipéptido dentro de la célula, y permitiendo que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido que codifica al polipéptido. La frase "permitir que un fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido" significa que se proporcionan condiciones dentro de una célula bacteriana Gram negativa de tal manera que un fago de lisis defectuosa sea capaz de empaquetar un polinucleótido.

El experto en la técnica comprenderá que en algunos casos el cultivo de células bacterianas Gram negativa para producir el polipéptido y permitir que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido pueden ocurrir simultáneamente. A manera de ejemplo no limitante, una célula bacteriana Gram negativa que comprende un profago auxiliar y un cósmido que codifica un polipéptido de interés pueden ser infectados con un fago de lisis defectuosa capaz de empaquetar al cósmido y luego cultivarse para producir el polipéptido.

Alternativamente, una célula bacteriana Gram negativa que comprende un profago auxiliar y un cósmido que codifica un polipéptido de interés pueden ser tratados para inducir las funciones de empaquetamiento del profago a través, por ejemplo, de inactivación por calor de una proteína represora lábil, o a través de inducción conjunta de una proteína activadora, y después se cultivan para producir el polipéptido.

De esta forma, se produce el polipéptido en la célula bacteriana Gram negativa mientras que simultáneamente se empaqueta el cósmido en el fago de lisis defectuosa.

En una realización, se retiene el fago de lisis defectuosa (es decir, encapsulado) dentro de una célula bacteriana Gram negativa permeabilizada y se criba el polipéptido para una actividad deseada de acuerdo con el método de la invención. Específicamente, se clona una biblioteca de genes que codifica el polipéptido que va a ser cribado en un fago de lisis defectuosa, o en un cósmido, y se introduce en una célula bacteriana Gram negativa. Tanto el empaquetamiento del fago como el polipéptido que va a ser cribado se pueden inducir conjuntamente (es decir, inducidos simultáneamente) y en el momento apropiado la población de células bacterianas Gram negativas se permeabilizan usando un detergente o disolvente orgánico con el polipéptido que es retenido dentro de la cápside celular, junto con el fago. La población de células bacterianas Gram negativas permeabilizadas se criba luego para la actividad deseada del polipéptido.

Las etapas de cultivo de la célula bacteriana Gram negativa para producir el polipéptido y permitir que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido que codifica al polipéptido también pueden llevarse a cabo secuencialmente en lugar de simultáneamente. Por lo tanto, las bacterias Gram negativas pueden ser cultivadas en primer lugar para producir el polipéptido, y posteriormente se permite que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido que codifica al polipéptido. La producción secuencial del polipéptido en la célula bacteriana seguido por el empaquetamiento del polinucleótido pueden ocurrir, por ejemplo, en los casos en que el polipéptido es codificado por un cósmido en la célula bacteriana, e infectar la célula bacteriana con un fago auxiliar permite que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido que codifica al polipéptido. En un ejemplo del método de la invención, la célula bacteriana comprende al profago P2 y/o P4 y la inducción de la activación del profago P2 comprende la inactivación un alelo represor sensible a la temperatura de la proteína C de P2 en la célula bacteriana y/o la expresión de proteínas activadoras de P4 en la célula bacteriana.

Alternativamente, las bacterias Gram negativas pueden ser cultivadas bajo condiciones adecuadas para la producción del polipéptido y permitir que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido que codifica al polipéptido puede comprender la inducción de la activación de un profago en la célula bacteriana para producir un fago, en donde el fago empaqueta al polinucleótido. Como comprenderá un experto en la técnica, la etapa de inducción de la activación del profago en la célula podría ser realizada simultánea o secuencialmente con la etapa de cultivo de la célula bacteriana Gram negativa para producir el polipéptido en la célula.

A la luz de la presente memoria descriptiva, el experto en la técnica comprenderá que existen varias formas en las que puede lograrse la inducción de la activación de un fago de lisis defectuosa para empaquetar un polinucleótido. Por ejemplo, la inducción de la activación de un fago de lisis defectuosa puede comprender la introducción de un fago satélite o auxiliar en una célula bacteriana Gram negativa que comprende un fago de lisis defectuosa que está presente tanto en el genoma de la célula bacteriana como en el profago.

Alternativamente, la inducción de la activación puede comprender la producción de una o más proteínas activadoras de un profago en una célula bacteriana. Por ejemplo, la célula bacteriana Gram negativa puede comprender un profago P2 y/o P4, y las proteínas activadoras de P2 y/o P4 pueden ser seleccionadas, por ejemplo, de uno o más de P2*cox*, P2*ogr*, P4δ y/o P4ε. Como resultado de la activación, un profago en una célula bacteriana produce un fago que empaqueta al polinucleótido. Alternativamente, la inducción de la activación de un fago de lisis defectuosa para empaquetar un polinucleótido puede comprender la inactivación de una o más proteínas represoras del fago en la célula bacteriana. En una realización particular de la invención, la inducción de la activación comprende la inactivación de un alelo represor sensible a la temperatura del profago lambda en la célula bacteriana. En otra realización, la inducción de la activación de un fago de lisis defectuosa comprende el aumento de la temperatura de incubación de las células bacterianas.

Permeabilización

En ciertas realizaciones del método de la invención, se permeabilizan ya sea solamente la membrana celular externa, o tanto las membranas celulares interna como externa de una célula bacteriana Gram negativa, permitiendo así que al menos algunos de los componentes celulares solubles se difundan a través de la pared celular. El polipéptido que se va a cribar para una actividad deseada se retiene dentro de la pared celular bacteriana, o está unido a la pared celular bacteriana. Como se usa en la presente memoria, los términos "permeabilización", "permeabilizada" o "célula bacteriana permeabilizada" se refieren al uso de un agente de permeabilización o tratamiento mecánico, o una combinación de ambos, para producir poros en la membrana externa o tanto en las membranas interna como externa, de una bacteria Gram negativa, o para solubilizar la membrana externa, o tanto las membranas interna como externa, de una bacteria Gram negativa, aunque que sin hidrolizar los enlaces entre peptidoglicanos manteniendo por lo tanto la pared celular intacta. Ejemplos no limitantes de agentes capaces de permeabilizar una célula bacteriana incluyen detergentes y disolventes orgánicos. Un ejemplo no limitante de un tratamiento mecánico capaz de permeabilizar una célula bacteriana es la electroporación.

La permeabilización permite convenientemente la entrada de proteínas de tamaño pequeño a moderado, por ejemplo hasta de 120 kDa, u otras moléculas de tamaño equivalente o menor, en la cápsula celular que permanece intacta. Además, al mantener la integridad de la pared celular bacteriana, las células bacterianas permeabilizadas son menos frágiles que los esferoplastos que se producen, por ejemplo, mediante el tratamiento de células bacterianas con lisozima en Tris-EDTA, en la que la pared celular bacteriana es al menos parcialmente hidrolizada. Las células bacterianas permeabilizadas producidas en ciertas realizaciones de los métodos de la presente invención son adecuadas para técnicas tales como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), mientras que los esferoplastos son dañados por el entorno de citometría de flujo de alta cizalla y requieren condiciones osmóticas controladas, limitando así sus usos potenciales.

Preferiblemente, el tratamiento de permeabilización preserva las proteínas celulares en su estado nativo y sus interacciones. Los detergentes no iónicos son generalmente menos perjudiciales para el plegamiento de las proteínas y los complejos de proteínas que los detergentes iónicos. De este modo, en una realización preferida, se utiliza un detergente no iónico para permeabilizar la pared celular bacteriana. Ejemplos no limitantes de detergentes no iónicos

incluyen Tritón X-100, Tritón X-114, Brij 35, Brij 58, Tween 20, Tween 80, sustituto de Nonidet P-40, Octil β Glucósido, Mega 8, Mega 9, Mega 10 , BigCHAP, Desoxi BigCHAP, Apo8 y 8TGP (n-octil-β-D-tioglucopiranósido).

Pueden usarse mezclas de detergentes para permeabilizar la célula bacteriana. Por ejemplo, el detergente puede ser una mezcla de dos o más detergentes no iónicos. En una realización, el detergente es una mezcla de Mega 10 y Apo8.

Cuando se criba el polipéptido para una actividad deseada se une a la pared celular bacteriana, o se integra o se une a la membrana celular interna, la persona experta se dará cuenta que puede no ser necesario permeabilizar la membrana interna de la célula bacteriana. Por lo tanto, en una realización la célula bacteriana se permeabiliza selectivamente. Por "permeabilizada selectivamente" se entiende que la membrana externa de la célula bacteriana permeabilizada está permeabilizada en una mayor extensión que la membrana interna, por lo que 50% o menos, o más preferiblemente 40%, 30%, 20%, 10%, 5% , 4%, 3%, 2%, 1% o menos, o ninguna, de una sustancia impermeable a la membrana, por ejemplo el ligando Gel Red de unión al ADN impermeable a la membrana, permea la membrana interna de una célula permeabilizada selectivamente cuando se compara con una célula permeabilizada en la que tanto las membranas interna como externa han sido permeabilizadas, tal como mediante el uso de una solución que comprende Mega 10 0,5% y Apo8 al 0,5%.

Aunque la persona experta será capaz de determinar las condiciones adecuadas para permeabilizar selectivamente una célula bacteriana de acuerdo con los métodos de la presente invención, en una realización la célula bacteriana se permeabiliza selectivamente con un detergente no iónico. Por ejemplo, el detergente no iónico puede seleccionarse de Apo8 y Tween20. En una realización, una solución para permeabilizar selectivamente la célula bacteriana comprende el detergente a una concentración de aproximadamente 0,2% hasta aproximadamente 0,4%, o aproximadamente 0,2% hasta aproximadamente 0,3%, o aproximadamente 0,2%. Preferiblemente, la solución para permeabilizar selectivamente la célula bacteriana comprende el detergente en un regulador que comprende Ca^{2+} o EDTA. Los ejemplos de reguladores adecuados para permeabilizar selectivamente una célula bacteriana incluyen Apo8 al 0,2-0,4% o Tween20 en Tris 5 mM, EDTA 1mM (pH 8,0) o Tris 25 mM, Ca^{2+} 2 mM (pH 8,0). En una realización, la permeabilización selectiva de una célula bacteriana se puede lograr, por ejemplo, incubando la célula en un regulador adecuado a aproximadamente 25ºC durante aproximadamente 10 minutos.

En otra realización, el agente capaz de permeabilizar una célula bacteriana Gram negativa es un disolvente orgánico tal como cloroformo. A modo de ejemplo, las membranas celulares bacterianas internas y externas pueden permeabilizarse mediante la suspensión de las células bacterianas Gram negativas en una solución acuosa que ha sido saturada con el disolvente lipofílico cloroformo. Para crear una solución saturada de cloroformo se requiere la mezcla de dos fases inmiscibles de agua y el disolvente orgánico mediante agitación de los dos, usualmente por agitación, o en un vórtice mecánico, hasta que la fase de cloroformo se suspenda en forma de gotitas finas. Las dos fases se dejan sedimentar, y se usa una centrifugación pulsada para ayudar en la separación de las fases. Una mezcla de cloroformo al 5% (v/v) es suficiente para crear una solución saturada. Un tiempo de incubación de 10 minutos a 25°C es suficiente para la permeabilización de ambas membranas celulares. El Ejemplo 19 y la Figura 22 describen y demuestran la permeabilización de y membranas interna y externa de *E. coli* usando disolvente orgánico, cloroformo.

Expresión del polipéptido

Un polipéptido que se va a cribar para una actividad deseada puede clonarse en un vector adecuado para la expresión en una célula bacteriana. "Vector", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier vector conocido en la técnica que sea adecuado para transformar una célula bacteriana. Preferiblemente, el vector es también capaz de replicarse dentro de la célula bacteriana independientemente del genoma del huésped. Los vectores incluyen plásmidos, virus y cósmidos, así como elementos lineales de ADN, tales como el fago lineal N15 de *E. coli* y/o ADN extracromosómico que se replica independientemente de un genoma de célula bacteriana. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión. Como comprenderá la persona experto en la materia, en realizaciones en las que el polinucleótido que codifica al polipéptido se empaqueta en un fago, el vector estará en una forma adecuada y comprende la secuencia necesaria (por ejemplo, tal como las secuencias cos en un cósmido), para empaquetar al polinucleótido en el fago.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "vector de expresión" es un vector que es capaz de efectuar la expresión de una molécula de polinucleótido especificada en una célula bacteriana. Preferiblemente, el vector de expresión también es capaz de replicarse dentro de la célula bacteriana. Los vectores de expresión adecuados típicamente contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de transcripción, secuencias de control de traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula bacteriana recombinante y que controlan la expresión de moléculas de polinucleótido que codifican un polipéptido. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, alargamiento y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tales como las secuencias promotora, de refuerzo, operadora y represora.

Las secuencias adecuadas de control de la transcripción incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en una célula bacteriana. Se conocen una variedad de tales secuencias de control de la transcripción por parte de los expertos en la técnica.

La transformación de un vector de expresión en una célula bacteriana se puede lograr mediante cualquier método adecuado por medio del cual se puede insertar una molécula de polinucleótido en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, pero no se limitan a, electroporación y transformación química. Las moléculas de polinucleótidos transformadas pueden permanecer extracromosomales o pueden integrarse en uno o más sitios dentro de un cromosoma de la célula transformada (es decir, recombinante) de tal manera que se mantiene su capacidad de expresión.

Se pueden usar tecnologías de ADN recombinante para mejorar la expresión de una molécula de polinucleótido transformada mediante la manipulación, por ejemplo, el número de copias de la molécula de polinucleótido dentro de una célula huésped, la eficiencia con la que se transcriben dichas moléculas polinucleotídicas, la eficiencia con la que las transcripciones resultantes son traducidas, y la eficiencia de las modificaciones postraduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de moléculas de polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, enlazar operativamente moléculas de polinucleótidos con plásmidos de alto número de copias, adición de secuencias de estabilidad del vector con plásmidos, sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, reforzadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosomas, secuencias de Shine-Dalgarno), modificación de moléculas de polinucleótidos para que correspondan al uso del codón de la célula huésped y la supresión de secuencias que desestabilizan los transcritos.

La persona experta en la materia será capaz de determinar fácilmente las cepas bacterianas adecuadas para expresar polipéptidos en los métodos de la invención. Aquellos expertos en la técnica comprenderán que las bacterias Gram negativas adecuadas para uso en los métodos de la invención incluyen *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*, *Campylobacter, Fusobacterium, Bordetella, Pasteurella, Actinobacillus, Haemophilus* y *Histophilalus*. En una realización preferida, las bacterias Gram negativas son *E. coli*

Complejos de proteínas

El polipéptido que va a ser cribado para una actividad deseada puede estar asociado con al menos un segundo polipéptido para formar un complejo de proteína que tiene un tamaño molecular tal que el complejo de proteína es retenido dentro de la célula bacteriana permeabilizada. El polipéptido puede estar asociado con el segundo polipéptido, por ejemplo, mediante enlaces covalentes tales como puentes disulfuro, o mediante asociación no covalente. "Asociación no covalente" se refiere a interacciones moleculares que no involucran un enlace interatómico. Por ejemplo, las interacciones no covalentes involucran enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas y fuerzas de van der Waals. Las fuerzas no covalentes se pueden utilizar para mantener las cadenas polipeptídicas separadas juntas en proteínas o en complejos de proteína. De este modo, el polipéptido y un segundo polipéptido pueden ser expresados como polipéptidos separados ya sea a partir del mismo o de diferentes vectores, o uno o ambos polipéptidos pueden expresarse a partir del ADN que codifica los polipéptidos que se han integrado en el genoma de la célula bacteriana.

Alternativamente, el polipéptido y el segundo polipéptido que están asociados en un complejo de proteína pueden ser una proteína de fusión. Como se utiliza en la presente memoria, "proteína de fusión" se refiere a una proteína híbrida, que consiste de dos o más polipéptidos, o fragmentos de los mismos, que resultan de la expresión de un polinucleótido que codifica al menos una porción de cada uno de los dos polipéptidos y unidos mediante un enlace peptídico.

La proteína completa es retenida en la célula bacteriana permeabilizada por el tamaño molecular

El segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido que tenga un tamaño molecular suficiente, es decir, un peso molecular o radio molecular suficiente, de tal manera que al menos parte del complejo formado con el polipéptido que se está cribando para una actividad deseada es incapaz de difusión a partir de la célula bacteriana permeabilizada . Por lo tanto, el complejo de proteínas es retenido dentro de la célula bacteriana después de la permeabilización de la célula. El experto en la materia apreciará que la naturaleza del segundo polipéptido, incluyendo su peso molecular y si es una proteína globular o de varilla (filamentosa), determinará su capacidad para prevenir o inhibir la difusión del complejo de proteína a través de la pared celular bacteriana. En una realización, el peso molecular del segundo polipéptido es de al menos aproximadamente 30 kDa, o al menos aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150 o más kDa. En una realización, el segundo polipéptido es de al menos aproximadamente 120 kDa.

En una realización, el segundo polipéptido forma multímeros que tienen un peso molecular mayor que el tamaño de exclusión de poros de la célula bacteriana permeabilizada. Como se usa en la presente memoria, el término "multímero" y sus variantes gramaticales se refieren a la formación de un complejo multimérico entre dos o más moléculas distintas. El multímero puede comprender, por ejemplo, dos o más moléculas de la misma proteína (es decir, un homomultímero) o una mezcla de dos o más proteínas diferentes o no idénticas (es decir, un heteromultímero). Las proteínas que forman

multímeros adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen aquellos que forman dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y multímeros de orden superior que comprenden siete o más subunidades.

Las proteínas multiméricas incluyen homodímeros, por ejemplo, isoformas α y β del receptor de PDGF, el receptor de eritropoyetina, MPL y el receptor de G-CSF, heterodímeros cuyas subunidades tienen dominios efectores y de unión al ligando, por ejemplo, isoforma αβ del receptor de PDGF y multímeros que tienen subunidades componentes con funciones dispares, por ejemplo, receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y GM-CSF. Los ejemplos no limitantes de otras proteínas multiméricas que pueden utilizarse en los métodos de la presente invención incluyen factores implicados en la síntesis o replicación de ADN, tales como proteínas de ADN polimerasa implicadas en la producción de ARNm, tales como TFIID y TFIIH; las proteínas asociadas a la célula, nucleares y otras asociadas a la membrana, tales como hormonas y otros receptores de transducción de señal, proteínas de transporte activo y canales iónicos, proteínas multiméricas en la sangre, incluyendo hemoglobina, fibrinógeno y el factor de von Willabrand; proteínas que forman estructuras dentro de la célula, tales como actina, miosina y tubulina y otras proteínas citoesqueléticas; proteínas que forman estructuras en el ambiente extracelular, tales como colágeno, elastina y fibronectina; proteínas involucradas en el transporte intra y extracelular, tales como quinesina y dineína, la familia SNARE de proteínas (receptor soluble de la proteína de unión a NSF) y clatrina; proteínas que ayudan a regular la estructura de la cromatina, tales como histonas y protaminas, Swi3p, Rsc8p y moira; factores de transcripción multimérica tales como Fos, Jun y CBTF (factor de transcripción de caja CCAAT); enzimas multiméricas tales como acetilcolinesterasa y alcohol deshidrogenasa; proteínas chaperonas tales como GroE, Gro EL (chaperonina 60) y Gro ES (chaperonina 10); antitoxinas, tales como veneno de serpiente, toxina de botulismo, súper antígenos de *Estreptococos*; Lisinas (enzimas de bacteriófagos y virus); así como la mayoría de las proteínas alostéricas. En una realización, la proteína multimérica es una proteína de *E. coli*. Ejemplos no limitantes de proteínas de *E. coli* que forman multímeros incluyen la L-ramnosa isomerasa (RhnA, por ejemplo número de acceso del NCBI CAA43002), β-galactosidasa (β-gal, por ejemplo número de acceso del NCBI YP 001461520), betaína aldehído deshidrogenasa (BetB, por ejemplo No de acceso de NCBI AAA23506), glutamato-5-quinasa (G5K, por ejemplo número de acceso del NCBI AAB08662), glutatión sintasa (GshB, por ejemplo número de acceso de NCBI AP_003504), y una cadena media de aldehído deshidrogenasa (YdcW, por ejemplo número de acceso de NCBI AP_002067).

En una realización, el polipéptido que es cribado para una actividad deseada tiene un tamaño molecular suficiente para retener al polipéptido dentro de la pared celular bacteriana. Por lo tanto, el experto en la técnica apreciará que tal polipéptido no necesita estar necesariamente asociado con un segundo polipéptido con el fin de retener al polipéptido dentro de la célula bacteriana permeabilizada.

Expresión de la cápside en fagos líticos y lisogénicos

En otra realización, el polipéptido puede estar unido a un complejo macromolecular más grande, tal como un bacteriófago y/o una proteína de recubrimiento del fago. La unión del polipéptido al fago se puede lograr mediante una fusión directa de los genes del polipéptido con el gen de una proteína de recubrimiento del fago, o puede ser mediante una fuerte interacción entre dos polipéptidos expresados separadamente. La unión de bibliotecas de proteínas sobre la superficie de la cabeza del bacteriófago lítico y lisogénico se conoce como "expresión de la cápside". Un ejemplo de proteínas de recubrimiento del fago que pueden adaptarse adecuadamente para la fusión al polipéptido son los genes para la proteína de lambda D de 11 kD (Sternberg y Hoess, 1995; Mikawa y colaboradores, 1996), que decora las cabezas del bacteriófago lambda o la proteína lambda V de 25 KD (Maruyama y colaboradores, 1994), que es la proteína de envoltura de la cola. Otros fagos líticos también han utilizado fusiones de polipéptidos con la proteína SOC de 9 kD de fagos similares a T4 (Rao y colaboradores, 2007) y fusiones con el extremo terminal C con la proteína de la cápside T7 de 42 kD, 10B (Dai y colaboradores, 2008). En el caso del sistema del bacteriófago P2/P4, los péptidos han sido expresados en el extremo terminal N de la proteína Psu de P4 de 21 kD (Lindqvist y Naderi, 1995).

Un ejemplo de un método de expresión de la cápside es la fusión de péptidos o polipéptidos con la proteína de la cápside, gpD, del bacteriófago lambda. Este método ha sido descrito ampliamente en la literatura (Sternberg y Hoess, 1995, Mikawa y colaboradores, 1996, Gupta y colaboradores, 2003, Vaccaro y colaboradores, 2006, Levy y colaboradores, 2007) y en la patente estadounidense No. 7.732.150 y la patente estadounidense No. 6.884.612.

Se ha demostrado que la proteína gpD de lambda tolera las fusiones de polipéptidos ya sea en el extremo terminal N o C (Mikawa y colaboradores, 1996) con una valencia de hasta -400 por fago, aunque una carga mayor a ~50% de proteína de fusión por cabeza disminuye la viabilidad del fago. Las comparaciones directas de la expresión de la cápside lambda contra la expresión del fago filamentoso demostró una expresión superior de la proteína de fusión y eficiencias de captura durante la exploración objetivo (Santini y colaboradores, 1998; Gupta y colaboradores, 2003). Aunque la expresión de la cápside lambda sería de mayor utilidad en el cribado de bibliotecas de anticuerpos, solamente ha sido citado como en uso por tres grupos. Gupta y colaboradores (2003) demostraron que un anticuerpo de una sola cadena (scFv) se plegó productivamente y era aproximadamente 100 veces más reactivo mediante un ensayo de ELISA que un anticuerpo expresado en un fago filamentoso. Similarmente, Vaccaro y colaboradores (2006) encontraron que lambda es una excelente plataforma de expresión de un scFv. Sin embargo, como muestran Vaccaro y colaboradores (2006) esto se debió a la notable y rara estabilidad del scFv que se había elegido, que se pudo plegar en el citoplasma. Estos autores demostraron que para otras secuencias de scFv era probable que hubiera dificultad en la

obtención de una expresión productiva. Levy y colaboradores (2007) reconocieron e hicieron uso de este hecho en un intento por utilizar la expresión de lambda como una criba genética para seleccionar las proteínas citoplasmáticas de *E. coli* que mejorarían el plegamiento productivo de los scFv en el citoplasma. Su resultado fue sólo una mejora muy modesta en el plegamiento productivo de un scFv. Los métodos de la presente invención pueden utilizar un andamiaje estable de scFv, tal como lo demostraron Gupta y colaboradores (2003) y Vaccaro y colaboradores (2006) en un sistema de expresión de cápside en un fago de lisis defectuosa.

Existen una cantidad de ventajas en la utilización de fagos de lisis defectuosa tanto para el empaquetamiento del polinucleótido como para la expresión del polipéptido codificado en la superficie de la cápside. En primer lugar, la cápside del fago sirve como una encapsulación estable, de endonucleasa protegida para el polinucleótido en una forma tal que, una vez liberado, permite un alto rendimiento de recuperación (se puede recuperar aproximadamente el 100% del fago empaquetado). En segundo lugar, la cápside del fago sirve como un sitio de unión estable y numeroso para el polipéptido codificado dentro de la célula permeabilizada. La Figura 25 demuestra que esta propiedad puede ser utilizada para visualizar directamente una unión de scFv con su objetivo fluorescente donde el scFv se fusiona con la proteína gpD lambda. Por lo tanto, la biblioteca de polinucleótidos empaquetada en un fago de lisis defectuosa, y además encapsulada por la célula permeabilizada, se puede usar en el método de expresión de proteínas de la invención. Un ejemplo de expresión usando esta realización sería para cribar la unión de un objetivo etiquetado de manera fluorescente con un anticuerpo o andamiaje de afinidad expresado en la cápside, donde la unión se detecta usando ya sea microscopía de fluorescencia o usando FACS. La Figura 25 demuestra la identificación positiva de la unión del objetivo fluorescente con un fago encapsulado que expresa un anticuerpo unido a la cápside usando FACS.

Una tercera ventaja de la expresión de la biblioteca y empaquetamiento usando un fago de lisis defectuosa es que la liberación fallida del fago de las células huésped inducidas permite la concentración del fago con altos títulos a través de centrifugación de las células huésped, seguido por permeabilización utilizando ya sea detergente o cloroformo, y lisis inducida usando lisozima purificada. Los inventores pueden reportar que los títulos de los fagos lambdoides pueden aumentarse 100 veces en comparación con los títulos de cultivo líquido de fagos lisados cuando se utilizan los mutantes de lisis defectuosa de los fagos para empaquetamiento. Es rutinario lograr títulos > 10^{11} fagos por mL de células lisadas por Readylyse (Epicentre) cuando se empaquetan los fagos utilizando mutantes de lisis defectuosa. Con el fin de lograr títulos de este nivel se requiere una precipitación laboriosa y ultracentrifugación de los lisados de fagos, lo que aumenta el riesgo de pérdida de la proteína de fusión unida a la superficie durante un procedimiento largo.

Aún otra mejora de la expresión de la cápside permitida por el método de la invención es que la proteína de fusión de la cápside soluble en exceso que no está unida a las partículas de fago encapsuladas puede ser eliminada fácilmente mediante permeabilización celular. Esta característica es importante para la unión del objetivo con las partículas de bacteriófago encapsuladas, ya que de otro modo puede producirse unión en solución con la proteína de fusión que no está unida a la cápside, y que usualmente está en exceso. Sin partición de la proteína de fusión unida a la cápside y soluble, la unión y/o captura de bacteriófagos que muestran una proteína de afinidad se reduciría.

Los Ejemplos 20 y 23 describen la fusión de proteínas de afinidad tanto del fago Hy5 (un híbrido de P2/186 con los genes estructurales de P2) como a las proteínas de la cápside del fago lambda, gpL y gpD, respectivamente, y su uso demostrado en el enriquecimiento a través del objetivo unido a la matriz.

El polipéptido que se va a cribar no necesita estar directamente fusionado con la proteína de recubrimiento del fago, sino que puede ser expresado como un polipéptido separado que está enlazado *in vivo* al exterior del fago a través de una asociación estable de los dominios de proteína. Un ejemplo de tal asociación puede ser la alta afinidad entre un dominio proteico y un ligando peptídico, tal como se observa entre péptidos de calmodulina y de unión a la calmodulina (CBP). Alternativamente, la asociación podría establecerse mediante una interacción covalente entre dos polipéptidos. Un ejemplo de esto serían las proteínas SNAP y CLIP (New England Biolabs) que se fusionarían por separado como asociados a la proteína de expresión y una proteína de recubrimiento del bacteriófago, y un ligando que está unido covalentemente por ambas proteínas.

Proteínas de unión al ADN

Los presentes inventores han encontrado que el ADN se retiene dentro de una célula bacteriana después de la permeabilización. De este modo, en una realización, el polipéptido está asociado con una proteína de unión al ADN para formar un complejo proteico que se une al ADN y que se retiene dentro de la célula bacteriana. Como se usa en la presente memoria, "proteína de unión al ADN" se refiere a cualquier proteína que comprende un dominio de unión al ADN que comprende al menos un motivo que reconoce ADN bicatenario o monocatenario. Como lo sabría un experto en la técnica, los dominios de unión al ADN incluyen una hélice-vuelta-hélice, un dedo de zinc, una cierre de leucina, una hélice alada, una hélice-vuelta-hélice alada, hélice-bucle-hélice, inmunoglobulina plegada que reconoce ADN, o dominios B3. La asociación del polipéptido con una proteína de unión al ADN proporciona ventajosamente una mejor recuperación de ADN, por ejemplo un plásmido, que codifica el polipéptido en los métodos de cribado de la invención.

Los ejemplos de proteínas de unión a ADN incluyen proteínas de competencia bacteriana tales como, pero sin limitarse a, proteínas de unión al ADN de *E. coli*, proteínas de unión al ADN de *Neisseria gonorrhoeae*, por ejemplo ComE,

proteínas E2 de Adenovirus, factor de transcripción AraC, factores de transcripción básicos hélice-bucle-hélice, factores de transcripción básicos del cierre de leucina, factor de respuesta de butirato, proteína B del centrómero, factores de transcripción COUP, factores de transcripción de respuesta de crecimiento temprano, factores de unión a la caja G, factores de transcripción GATA, proteínas HMGA, proteínas de homeodominio, proteínas I-kappa B, factores de integración del huésped, factores reguladores del interferón, factor 3 del gen estimulado por interferón, factores de transcripción de tipo Kruppel, proteína reguladora sensible a la leucina, proteínas de unión a la región de unión a la matriz, proteína de unión a metil-CpG, proteína homóloga 2 de MutS, proteína de leucemia mieloide-linfoide, NF-Kappa B, factores de transcripción NF1, factores respiratorios nucleares, proteína oncogénica p55, complejo de reconocimiento de origen, factores de transcripción de caja apareada, factores de dominio POU, factores del protooncogén, Rad51recombinasa, proteína de reparación y recombinación de ADN de Rad52, proteína A de replicación, proteína C de replicación, proteína de retinoblastoma, proteínas de Smad, factores de transcripción SOX, proteínas del dominio de caja T, factores de transcripción TCF, proteínas de unión a telómeros, receptor 9 similar a Toll, activadores trans y factores de transcripción de hélice alada. En una realización, la proteína de unión al ADN es una proteína de unión al ADN de *E. coli*. En otra realización, la proteína de unión al ADN es una proteína *Neisseria gonorrhoeae*, por ejemplo ComE, o un dominio del mismo.

Proteínas de unión a la pared celular

El polipéptido que está siendo cribado para una actividad deseada puede ser asociado con una proteína de unión a la pared celular bacteriana. El experto en la técnica comprenderá que la elección de una proteína de unión a la pared celular dependerá de la especie de la célula huésped, ya que las diferentes bacterias tienen diferentes composiciones de la pared celular. Aunque que las bacterias tienen paredes celulares compuestas de peptidoglicano (PG), las modificaciones químicas entre especies pueden afectar la unión de especies cruzadas. El experto en la técnica podrá determinar fácilmente las proteínas de unión a la pared celular adecuadas para uso en una especie bacteriana particular.

Las proteínas de unión a la pared celular bacteriana incluyen proteínas conocidas por tener una estructura de dominio, por lo que parte de la cadena polipeptídica en la estructura nativa es capaz de reconocer y unir moléculas específicas o conformaciones moleculares en la pared celular bacteriana. Por lo tanto, el término "proteína de unión a la pared celular bacteriana" incluye un dominio proteico que es parte de la proteína que se une específicamente a la pared celular bacteriana. Ejemplos de proteínas de unión a la pared celular bacteriana incluyen las hidrolasas de la pared celular codificadas por bacteriófagos, hidrolasas de la pared celular de bacterias y diferentes autolisinas. Se incluyen además moléculas receptoras codificadas por el ADN de bacteriófagos y otros virus. Cuando la proteína de unión a la pared celular bacteriana proviene de enzimas hidrolíticas de origen bacteriófago, que son capaces de unirse específicamente a bacterias, la proteína de unión a la pared celular mantiene su capacidad de unión pero preferiblemente no tiene actividad hidrolítica significativa.

En una realización, la proteína de unión a la pared celular se une no covalentemente a la pared celular de *E. coli*. Por ejemplo, para una célula huésped de *E. coli* existen proteínas endógenas de unión a PG con un dominio de unión a PG de ~100 aminoácidos conservados que se presenta en PAL, OmpA, YiaD, YfiB y MotB (Parsons y colaboradores, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que las proteínas de otros organismos están bien expresadas en *E. coli* y para unir la pared celular con alta afinidad, por ejemplo el dominio de unión a PG de ~70 aminoácidos del fago φKZ de Pseudomonas (KzPG) (Briers y colaboradores, 2009). De este modo, se puede utilizar un dominio de unión a PG de una proteína que se une a PG como una proteína de unión a la pared celular bacteriana en los métodos de la invención.

En un ejemplo de una realización, el dominio de unión a PG se puede fusionar con el polipéptido que está siendo cribado para una actividad deseada y expresado en el citosol de la célula bacteriana. Después de la permeabilización de la membrana, el dominio de unión a PG gana acceso y se une a la pared celular dando como resultado la retención del polipéptido de interés dentro de la célula permeabilizada. Para mejorar potencialmente adicionalmente la retención del polipéptido de interés dentro de la célula, el experto entenderá que el polipéptido puede estar asociado con una proteína de unión al ADN además de una proteína de unión a la pared celular bacteriana.

Alternativamente, el polipéptido de interés puede estar asociado con una proteína que es capaz de enlazarse covalentemente con la pared celular bacteriana. Preferiblemente, la proteína comprende una señal de orientación periplásmica. Por lo tanto, el polipéptido se expresa en el citosol de la célula bacteriana, pero se dirige al periplasma donde se enlaza con la pared celular antes de la permeabilización de la membrana.

A manera de ejemplo no limitante, la proteína de unión a la pared de la célula bacteriana que se une a la pared celular en forma covalente puede ser una lipoproteína capaz de unirse a la pared celular y que carece de una secuencia señal funcional del extremo terminal N necesaria para la unión a la membrana externa. Por ejemplo, la lipoproteína puede ser LPP de *E. coli*. LPP es una proteína abundante de *E. coli* que forma una bobina trimérica en espiral. En su forma nativa, un extremo está atado a la membrana externa a través de lipidación y el otro extremo está unido covalentemente a la pared celular a través de una lisina del extremo terminal C. La lipoproteína puede comprender además una secuencia que dirige a la lipoproteína al periplasma, por ejemplo una secuencia de direccionamiento periplásmico OmpF. En una

realización, la lipoproteína es lipoproteína de *E. coli* que carece de una secuencia señal funcional del extremo terminal N, necesaria para la unión a la membrana externa.

A la luz de las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, el experto en la técnica será capaz de identificar o diseñar proteínas que se unan covalentemente a la pared celular bacteriana y que sean adecuadas para uso en los métodos de la presente invención.

En una realización de la invención, el polipéptido que es cribado para una actividad deseada es un polipéptido de fusión que comprende un dominio KzPG y uno o más dominios seleccionados de un espaciador, SNAP y/o DBP. En una realización particular, el polipéptido de fusión comprende uno o más espaciadores y los dominios KzPG, SNAP y DBP.

Espaciadores

En una realización, el polipéptido que se criba para una actividad deseada puede expresarse como un polipéptido de fusión que comprende uno o más espaciadores. Un "espaciador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido o polipéptido que puede estar incluido en un polipéptido de fusión para aumentar la expresión del polipéptido en una célula bacteriana o para disminuir el impedimento estérico de tal manera que el polipéptido que se está cribando para una actividad deseada puede asumir su estructura terciaria deseada y/o interactuar adecuadamente con su molécula objetivo. De este modo, la proteína de fusión puede comprender uno o más espaciadores antes, después o entre uno o más dominios polipeptídicos en el polipéptido de fusión. Para espaciadores y métodos de identificación de espaciadores deseables, véase, por ejemplo, George y colaboradores (2003).

En una realización, el espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos que están entre 1-50 residuos de aminoácidos de longitud, o aproximadamente 1-25 residuos, o aproximadamente 5-15 residuos de longitud. Por ejemplo, el espaciador puede seleccionarse de uno o más de I27, RL1, RL2, RL3, RL4, RL5 y/o RL6. El experto en la técnica entenderá que se puede introducir un número limitado de sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos en el espaciador sin afectar su capacidad para funcionar como un espaciador. En una realización particular, los uno o más espaciadores se seleccionan de cualquiera de las SEQ ID NOs: 6 a 12 ó 16. Por lo tanto, en una realización, el polipéptido que se está cribando para una actividad deseada es un polipéptido de fusión que comprende I27, RL6, *KzPG*, SNAP y DBP.

En otra realización, la región espaciadora puede comprender una secuencia peptídica que es un sitio de unión de alta afinidad para un dominio proteico. Por ejemplo, la calmodulina tiene una afinidad dependiente de Ca^{2+} para una cantidad de secuencias peptídicas de ligandos de proteínas que han sido mapeados para regiones peptídicas cortas. Estos CBP (péptidos de unión a calmodulina) han sido mutados para una unión de afinidad incluso mayor con calmodulina (Kd entre ~1 nM a 1 pM) (Montigiani y colaboradores, 1996), permitiendo una interacción de alta afinidad entre dos proteínas intercambiable por Ca^{2+}, teniendo una, una región espaciadora de CBP y la otra fusionada a calmodulina.

Métodos de cribado y evolución de proteínas

La presente invención proporciona métodos para cribar polipéptidos para una actividad deseada contra una molécula objetivo. Como se utiliza en la presente memoria, el término "actividad deseada" se refiere a cualquier actividad potencial útil de un polipéptido e incluye, pero no se limita a, unión, modificación enzimática, estabilidad de plegado y/o estabilidad térmica.

El término "molécula objetivo" se refiere a una molécula que se une a y/o es modificada por el polipéptido y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor, un antígeno, una enzima, etc. Por lo tanto, se puede usar "molécula objetivo" para referirse a un sustrato tal como un sustrato enzimático o una molécula que está siendo evaluada para unión (por ejemplo, un ligando, epítopo, antígeno, compañero de multimerización tal como un compañero homo o heterodimérico, etc., o cualquier combinación de los mismos).

Se apreciará que las actividades del polipéptido pueden cribarse para o seleccionarse en el contexto de un único tipo de célula que expresa un solo polipéptido o en el contexto de una biblioteca de células que expresan cada una de ellas un polipéptido o una variante de polipéptido diferente. Por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden utilizar para la evolución de la proteína *in vitro*. La evolución de la proteína *in vitro* permite que una gran cantidad de funciones y características de la proteína sean investigadas y comprende típicamente dos etapas principales: diversificación y selección. La diversificación se basa en la capacidad para generar diversas bibliotecas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos. La selección puede lograrse mediante cribado de las bibliotecas para una actividad deseada y enlazando la actividad con el genotipo, por ejemplo, mediante la identificación del miembro de la biblioteca que comprende al genotipo que es responsable de la actividad observada.

Las bibliotecas de ADN son una colección de vectores recombinantes que contienen insertos de ADN (fragmentos de ADN) que codifican un polipéptido. El origen de los insertos de ADN puede ser genómico, ADNc, sintético o

semisintético. El polipéptido puede tener cualquier actividad deseada, por ejemplo el polipéptido de interés puede ser una proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, o una enzima, por ejemplo, una polimerasa, ligasa, enzima de restricción, topoisomerasa, quinasa, fosfatasa, enzima metabólica, enzima catalítica, o una hormona del factor de crecimiento, péptido antimicrobiano, antígeno, receptor, proteína reportera, proteína inmunomoduladora, neurotransmisor, proteína estructural, factor de transcripción o transportador. En una realización, el polipéptido es un anticuerpo o una enzima. Por lo tanto, los métodos de la presente invención se pueden usar para cribar variantes de un polipéptido que tiene una actividad deseada.

La clonación y construcción de bibliotecas de ADN de, por ejemplo, proteínas o enzimas de unión, se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Lutz y Patrick (2004) han revisado los métodos de generación de la variabilidad de las bibliotecas y las estrategias de recombinación génica para uso en la ingeniería de proteínas. Para cribado de las variantes polipeptídicas expresadas, las estrategias utilizadas para las bibliotecas expresadas en la superficie podrían adoptarse y adaptarse para los métodos de la presente invención (Becker y colaboradores, 2004, Daugherty y colaboradores, 2000, Kenrick y colaboradores, 2007, Miller y colaboradores, 2006).

Se puede introducir una biblioteca de ácidos nucleicos en una pluralidad de células bacterianas dando como resultado la expresión de un miembro de la biblioteca en cada una de las células bacterianas. Además de ser expresados, los polipéptidos se retienen dentro de la célula bacteriana permeabilizada, o se unen a la pared celular, con el fin de evaluar su función o característica. Las bibliotecas de ácido nucleico de un polipéptido, por ejemplo, una proteína de unión tal como un anticuerpo, o de una enzima, se pueden generar a través de una diversidad de métodos incluyendo a través de la introducción de mutaciones tales como mutaciones puntuales, supresiones, e inserciones, o a través de eventos de recombinación. Los métodos para la generación de bibliotecas de variantes son conocidos en la técnica e incluyen PCR propensa a errores, síntesis de ADN en bacterias comprometidas en la reparación del ADN y modificación química del ADN. Los métodos para la generación de bibliotecas mediante recombinación son conocidos en la técnica e incluyen mezcla de genes, ensamblaje de ADN en bacterias altamente recombinogénicas, ensamblaje de bibliotecas de ácido nucleico sintéticas, etc., o cualquier combinación de los mismos. De esta forma, se puede introducir una biblioteca de polinucleótidos que codifican polipéptidos en una pluralidad de células bacterianas, dando como resultado la expresión de uno o más miembros de la biblioteca en cada una de las células bacterianas.

En algunas realizaciones, una biblioteca comprende dos o más variantes de un polipéptido en el que cada variante comprende un polipéptido único con un cambio menor en la secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones, una biblioteca comprende dos o más secuencias no relacionadas. Por ejemplo, para identificar un polipéptido candidato que puede inhibir una enzima, se puede interrogar una biblioteca de secuencias aleatorias o secuencias predeterminadas. Una biblioteca puede tener al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 1000, al menos 10.000, al menos 100.000, al menos 1.000.000, al menos 10^7 o más miembros.

Expresión de la proteína de unión

En una realización, los métodos de la presente invención se aplican a la evolución de proteínas de unión, tales como por ejemplo anticuerpos. Por lo tanto, en una realización, el polipéptido que se criba para una actividad deseada es una proteína de unión, la molécula objetivo puede ser cualquier molécula a la que pueda unirse la proteína de unión, y la actividad deseada es unión, y/o el grado de unión con la molécula objetivo. Los métodos de la invención pueden comprender, por ejemplo, el cultivo de una célula bacteriana que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de unión de manera que la proteína se produce en la célula. La célula se permeabiliza posteriormente y la célula permeabilizada se pone en contacto con una molécula objetivo. Se puede usar cualquier método adecuado en la técnica para determinar si el polipéptido se une y/o el grado de unión a la molécula objetivo.

Los métodos de la invención son particularmente adecuados para el cribado de bibliotecas que expresan la proteína de unión. A diferencia de otros procedimientos de expresión superficial *in vivo*, los cuales requieren absolutamente el direccionamiento de la proteína a un espacio extracelular, ya que las membranas celulares evitan la interacción con el objetivo marcado presentado a la proteína de expresión, los métodos de la invención pueden expresar y plegar las proteínas de afinidad en el citoplasma de la célula huésped. Por lo tanto, los parámetros de cribado pueden incluir el alto rendimiento y el plegamiento productivo de la proteína variante de afinidad en el citoplasma de las bacterias.

Además, como la expresión y el plegado de la proteína citoplasmática es en un ambiente reductor, los métodos de la invención pueden aplicarse para seleccionar variantes de anticuerpos, u otras proteínas que tienen enlaces disulfuro en su forma nativa, que pueden plegarse productivamente en un ambiente reductor. Se esperaría que las variantes seleccionadas fueran más estables ya que no dependerían de los enlaces disulfuro intra o inter dominios para la estabilidad de plegado. Este enfoque tiene aplicación para el desarrollo de anticuerpos que podrían utilizarse para la unión intracelular de objetivos, ya sea para neutralizar o para marcar.

Los métodos de la invención pueden por lo tanto utilizarse como una plataforma para la expresión y selección de una variedad de proteínas de unión, incluyendo aquellos andamiajes conocidos en la técnica, tales como anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio, Fab, y los andamiajes que no son de anticuerpo tales como lipocalinas, FN3, ubiquitina, γ-B-cristalina.

Cribado de polipéptidos en combinación con expresión en fagos

La expresión convencional en fagos, con el polipéptido que está siendo cribado unido a la superficie de un fago filamentoso, generalmente en sólo una o algunas copias, permite el cribado de un gran número de clones en paralelo por afinidad con una molécula objetivo. Sin embargo, el ambiente de los clones de baja y moderada afinidad es alto y no se pueden distinguir clones únicos sin subclonación y secuenciación, y la determinación de las propiedades de cada clon único (por ejemplo, niveles de expresión, solubilidad y afinidad) usualmente requiere de un cambio en el formato de expresión. Por lo tanto, en los métodos de la técnica anterior, una cantidad sustancial de trabajo se encuentra secuencia abajo del cribado inicial de expresión en fago.

En comparación, los métodos de la invención permiten el uso de FACS para caracterizar polipéptidos dentro o unidos a células bacterianas Gram negativas. FACS permite definir los parámetros de unión resultando en clones con las características deseadas altamente enriquecidas. Sin embargo, el cribado de clones individuales es secuencial e incluso con velocidades de clasificación de 10^4 clones por segundo existe un límite superior comparativamente bajo en el número de individuos que pueden ser procesados en un cribado. Por ejemplo, el cribado de 10^8 clones puede tardar más de 2 horas.

Por lo tanto, en ciertas circunstancias, puede ser deseable combinar el cribado paralelo de sistemas convencionales de expresión en fagos con la caracterización clonal de expresión celular analizada por FACS como se proporciona en la presente invención. Por lo tanto, los cribados tempranos pueden realizarse mediante expresión convencional en fagos, siendo posteriormente analizados los clones de salida por el sistema de expresión de la presente invención en el que el polipéptido es retenido dentro de la célula bacteriana por la pared celular y/o por unión a la pared celular, o mediante la unión a un fago encapsulado de lisis defectuosa.

De este modo, una biblioteca de genes puede expresarse y mostrarse en la superficie de un fago lítico o fago filamentoso usando fusiones con proteínas de fagos, o través de asociación estable de dos polipéptidos como se describe en la presente memoria. Estos fagos pueden ser cribados por la actividad del polipéptido ('exploración') usando técnicas estándar para expresión en bacteriófagos. La expresión en fagos de la proteína de fusión que se adhiere a una molécula objetivo, tal como un sustrato de afinidad, puede producirse y recuperarse como, por ejemplo, cósmidos por infección en la cepa auxiliar que contiene al profago lisógeno. Este ciclo puede repetirse hasta que la biblioteca esté dominada por clones enriquecidos. En este punto, la biblioteca podría subclonarse en un sistema de vectores que realice la expresión encapsulada de acuerdo con el método de la invención.

Por consiguiente, en una realización de la presente invención, se lleva a cabo una etapa de cribado adicional antes y/o después del método de cribado de la invención. Como se ha indicado anteriormente, el cribado adicional implica un sistema convencional de expresión en fagos, es decir, un sistema de expresión en fagos en el que: i) el polinucleótido que codifica al polipéptido que es cribado para una actividad deseada no se empaqueta en un fago de lisis defectuosa, y /o ii), el polipéptido no es retenido dentro de la célula bacteriana por la pared celular bacteriana y/o se une a la pared celular bacteriana. Dicho cribado adicional puede involucrar métodos conocidos de expresión en fagos tal como el uso de fagos lítico lambda o el fago M13 filamentoso.

En una realización adicional del método de la invención, el método convencional de expresión en fagos se puede combinar con el uso del fago de lisis defectuosa y de expresión celular encapsulada para permitir la conmutación fácil entre las dos formas de expresión de proteínas, sin subclonación adicional del ADN de la biblioteca enriquecida.

En esta realización, la proteína que se va a expresar puede codificarse como una fusión a una proteína de la cápside del fago mediante un polinucleótido clonado en un bacteriófago o fagémido de lisis defectuosa, o en un cósmido que puede ser empaquetado por un profago. Los métodos para construir un vector bacteriófago para expresión en la cápside, tal como un vector lambda, se describen en Mikawa y colaboradores (1996), Sternberg y Hoess (1995), y Vaccaro y colaboradores (2006). Los métodos para la construcción de vectores de fagémidos y cósmidos son también conocidos en la técnica. Por ejemplo, los vectores fagémidos basados en los orígenes de pUC y pBR322 fueron descritos por Yankovsky y colaboradores (1989) y King y colaboradores, (1982), respectivamente. Para los cósmidos lambda, Sambrook y Russell (2001), y para los cósmidos P2/P4/186, Kahn y colaboradores (1991), ambos proporcionan buenas descripciones generales y detalles de los vectores. El cósmido será transformado en una línea celular bacteriana que contiene un profago de lisis defectuosa e inducido tanto para la expresión de la proteína de fusión de la cápside como para el empaquetamiento del vector cósmido.

Alternativamente, el vector de bacteriófago de lisis defectuosa se transforma/infecta en una célula huésped y es igualmente inducido para expresión de la proteína de fusión de la cápside y el genoma del vector de bacteriófago.

Después del empaquetamiento del vector bacteriófago/cósmido, las células pueden lisarse para liberar el fago empaquetado mediante el tratamiento combinado de una etapa de permeabilización usando detergente o un disolvente orgánico tal como cloroformo, y una actividad enzimática de lisozima, tal como la comercialmente disponible como ReadyLyse (Epicentre). La biblioteca de expresión puede ahora ser "explorada" para unión a un objetivo mediante

métodos comúnmente usados para la selección de expresión en fagos. Después de la exploración, la biblioteca puede ser recuperada por reinfección en el huésped bacteriano que contiene el profago de lisis defectuosa. Los ciclos de exploración y reinfección pueden repetirse hasta que la proporción del fago de unión se enriquezca sustancialmente en la población de la biblioteca, momento en el que el siguiente ciclo de producción de fagos se permeabilizan las células, pero se omite la etapa de lisis enzimática, produciendo una sub-biblioteca de fagos encapsulados. Un objetivo marcado en forma fluorescente puede unirse a estos fagos encapsulados que pueden entonces ser clasificados por FACS, como se describe en el Ejemplo 23 y se observa en la Figura 25.

El experto en la técnica apreciará que esta realización, asegura que la biblioteca de expresión se mueva entre dos modos diferentes de expresión; 1) exploración del fago libre con el objetivo inmovilizado que es un cribado altamente paralelo con baja selectividad clonal; y 2) caracterización y purificación por FACS de clones individuales encapsulados, que es un cribado altamente selectivo pero de bajo rendimiento. Por lo tanto, esta realización del método de la invención permite utilizar los elementos más potentes de cada sistema sin la intervención del usuario para el reformateo que de otro modo sería necesario. Tal realización es, por lo tanto, altamente susceptible a un flujo de trabajo robótico de alto rendimiento.

En otra realización del método de la invención, los anticuerpos solubles pueden identificarse y utilizarse como andamiajes en bibliotecas de genes que pueden conmutarse entre la expresión en fagos y la expresión celular bacteriana Gram negativa mediante el método de la invención.

Expresión enzimática

Los métodos de la invención pueden usarse para la expresión de enzimas y bibliotecas de enzimas y para la evolución de las propiedades enzimáticas. Por tanto, en una realización, el polipéptido que se criba para una actividad deseada es una enzima, la molécula objetivo es un sustrato de la enzima, y la actividad deseada es la unión a y/o modificación enzimática de la molécula objetivo. El experto en la materia comprenderá que los métodos para el desarrollo de ensayos para actividades enzimáticas que utilizan otras tecnologías de expresión superficial podrían aplicarse igualmente como ensayos a los métodos de la invención.

Los métodos de la invención también serían adecuados en el uso de bibliotecas de enzimas que se expresan en la célula huésped, que se permeabiliza y luego se suspende como una emulsión de agua en aceite en agua (w/o/w). Aharoni y colaboradores (2005) demostraron que la utilidad del uso de bibliotecas de enzimas expresadas en la superficie celular en una emulsión w/o/w mediante FACS para la mejora de la paraoxonasa. Las ventajas de la encapsulación en una membrana oleosa no permeable son que un sustrato que puede difundirse y un producto pueden mantenerse en la proximidad de la actividad enzimática y de la secuencia de ácido nucleico codificante. Sin embargo, la criba descrita por Aharoni y colaboradores (2005) requiere que la enzima se exprese en el exterior de la célula huésped. Utilizando los métodos de la invención, la expresión intracelular y el plegamiento de bibliotecas de enzimas podrían usarse para mejorar la función enzimática.

En los métodos de la invención, se cultiva una célula bacteriana que comprende un polinucleótido que codifica una enzima con el fin de producir la enzima. Después de la permeabilización de la célula bacteriana, la célula se pone en contacto con un sustrato de la enzima y se pueden usar métodos conocidos para determinar si se modifica la enzima y/o la velocidad de modificación enzimática del sustrato.

En algunos casos, puede ser deseable que la molécula objetivo (por ejemplo un sustrato enzimático) se enlace a la célula bacteriana. El experto entenderá que la molécula objetivo puede enlazarse a cualquier componente de la célula bacteriana permeabilizada, ya sea directa o indirectamente. El enlazamiento directo puede lograrse, a manera de ejemplo no limitante, mediante enlazamiento de la molécula objetivo con la pared celular bacteriana. El enlazamiento indirecto de la molécula objetivo puede lograrse, por ejemplo, mediante enlazamiento de la molécula objetivo con el segundo polipéptido que está asociado con el polipéptido que se está cribando para que una actividad deseada forme un complejo proteico. Por ejemplo, la molécula objetivo puede enlazarse al polipéptido que tiene un tamaño molecular suficiente para retener el complejo proteico dentro de la célula bacteriana permeabilizada, o puede enlazarse con la proteína de unión al ADN o a la proteína de unión de la pared celular bacteriana como se usa en los métodos de la invención. El enlazamiento de la molécula objetivo a la célula bacteriana permite ventajosamente el aislamiento de células bacterianas que presentan enzimas activas utilizando tecnologías tales como, por ejemplo, FACS o mediante selecciones con perlas magnéticas.

El experto en la técnica podrá determinar fácilmente una química de acoplamiento adecuada para enlazar una molécula objetivo con una célula bacteriana. Las químicas de acoplamiento adecuadas incluyen marcación de cisteína con reactivos de acoplamiento de tiol tales como acrilato y maleimida, marcación con amina y marcación con carboxilo que están comercialmente disponibles a través de proveedores incluyendo Pierce Protein Research Products e Invitrogen.

Análisis de citometría de flujo

La tecnología de expresión celular de la presente invención puede presentar muchos miles de moléculas de un polipéptido de interés a la vez y, a diferencia de las tecnologías de expresión molecular tales como expresión ribosomal/ARNm o expresión en fagos, puede ser cribada usando técnicas de citometría de flujo, por ejemplo usando máquinas de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). No sólo se pueden capturar eventos positivos en la biblioteca, sino que se pueden definir simultáneamente parámetros tales como expresión de proteína, actividad enzimática o afinidad objetivo para cada miembro positivo, mejorando por lo tanto la salida del cribado. Los instrumentos para llevar a cabo la citometría de flujo son conocidos en la técnica e incluyen FACS Star Plus, FACScan y FACSort (Becton Dickinson), Apis C y MoFlo. Las técnicas de citometría de flujo en general implican la separación de células en una muestra líquida. Típicamente, el propósito de FACS es analizar las células para una o más características, por ejemplo, la presencia de una molécula objetivo. Los métodos para realizar el análisis de citometría de flujo son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describe una revisión de método usando FACS para evaluación de la actividad enzimática por parte Farinas (2006).

Para la presente invención, es útil la citometría de flujo para múltiples rondas de cribado que pueden llevarse a cabo secuencialmente. Las células pueden ser aisladas de una ronda inicial de clasificación e inmediatamente reintroducidas en el citómetro de flujo y cribadas de nuevo para mejorar la rigurosidad del cribado. Ya que la citometría de flujo es esencialmente una tecnología de clasificación de partículas, la capacidad para cultivar células no es necesaria. Las técnicas para la recuperación de ácidos nucleicos a partir de células no viables son bien conocidas en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, técnicas de amplificación dependientes de la plantilla incluyendo PCR.

Después de que se ha identificado una célula bacteriana Gram negativa que produce un polipéptido que tiene una actividad deseada, el ADN que codifica el polipéptido puede aislarse de la célula bacteriana usando cualquier técnica conocida adecuada. De este modo, el ADN que codifica el polipéptido puede aislarse y secuenciarse usando procedimientos convencionales. Si se desea, el polinucleótido puede pasar a través de otra ronda de diversificación con el fin de generar otra biblioteca de variantes que se criba para la actividad deseada. De esta manera es posible utilizar un proceso repetitivo para optimizar la actividad deseada de un polipéptido.

En las realizaciones en las que el polinucleótido es empaquetado por un fago de lisis defectuosa, los polinucleótidos que codifican los miembros polipeptídicos de la biblioteca que tienen una actividad deseada pueden recuperarse fácil y rápidamente del cribado posterior a FACS para un enriquecimiento repetitivo adicional o para análisis clonal mediante recuperación de la biblioteca de fagos, o de la biblioteca de cósmidos empaquetada, por tratamiento de las células bacterianas permeabilizadas con una lisozima, por ejemplo, ReadyLyse (Epicentre), para degradar la pared celular y liberar el fago para la infección subsiguiente.

De este modo, esta realización de la invención permite la caracterización concurrente de parámetros de expresión y de unión con el cribado por FACS, junto con la fácil recuperación y manipulación de bibliotecas de genes empaquetadas en fagos. Las rondas repetitivas de cribado por FACS usando bibliotecas de fagos de lisis defectuosa se simplifican por lo tanto y no dependen de la amplificación por PCR de los clones positivos con el consiguiente error de mutación y la manipulación requerida.

Empaquetamiento de bibliotecas de genes usando fagos de lisis defectuosa.

Los presentes inventores han encontrado que el uso de un profago de lisis defectuosa inducible permite la clonación y el empaquetamiento de alta eficiencia de una biblioteca de genes en bacterias Gram negativas. Un profago inducible es uno que está presente en el genoma de una célula bacteriana Gram negativa, en la que tras la inducción de la activación del profago, el profago se activa como un fago en la célula bacteriana. El fago en la célula puede entonces ser capaz de empaquetar un polinucleótido.

Los polinucleótidos que codifican las proteínas que van a ser cribadas por los métodos de expresión de la invención pueden empaquetarse en fagos que tienen una etapa lítica o, alternativamente, en un fago de lisis defectuosa. Tanto los genomas de fagos líticos como lisogénicos generalmente tienen una región que es dispensable para cualquier ciclo de vida, y puede ser reemplazada por un gen clonado y regiones reguladoras asociadas. Las regiones dispensables pueden incluir regiones que contienen genes para la recombinación del ADN (por ejemplo, los genes bet y exo del bacteriófago lambda y la región *Nin*5), o regiones que proporcionan funciones de supervivencia de la célula huésped con un lisógeno (por ejemplo, el fago lambda Ea47, Ea31, Ea59, genes Lom y bor; el fago *Old* P2, y genes *Fun*). Alternativamente, puede haber una tolerancia para el empaquetamiento de genomas que son fraccionalmente mayores de lo normal (por ejemplo, el bacteriófago Lambda empaquetará hasta 105% de la longitud de tipo silvestre de 48,5 kb) permitiendo la clonación de regiones cortas directamente en el genoma sin reemplazo de regiones no esenciales, tal como en el sistema de expresión T7 Select Phage (Novagen). Cuando la biblioteca de genes va a ser clonada en un vector bacteriófago de lisis defectuosa, los genes de lisis también representan una región dispensable.

Siempre que sea posible, el polinucleótido que codifica el polipéptido que se está cribando para una actividad deseada debe clonarse en una región del genoma del fago de tal manera que no interrumpa la transcripción y traducción de los operones esenciales del bacteriófago. Por lo tanto, el experto entenderá que el polipéptido puede expresarse usando sus propias regiones reguladoras de la transcripción tales como, por ejemplo, su propio promotor y/o terminador.

Las bibliotecas génicas de los polipéptidos que van a ser cribados para una actividad deseada también se pueden construir usando elementos que instruyen a un fago auxiliar para empaquetar un plásmido como una partícula infecciosa de fago. Por ejemplo, las regiones *cos* de los bacteriófagos Lambda, P2, P4 y de otros fagos lambdoides son elementos de <500 pb que tienen los sitios de unión y de escisión para la enzima terminasa, que corta y empaqueta un plásmido que contiene estas regiones como un elemento lineal dentro de una cabeza de cápside de fago. Estas regiones *cos* se pueden clonar en un plásmido que es luego denominado en la técnica como un cósmido. En general, el tamaño de un cósmido debe ser cercano al tamaño del genoma de tipo silvestre, usualmente dentro dl 80 a 105% del genoma del fago de tipo silvestre, que va a ser empaquetado eficientemente. Alternativamente, puede ser una fracción unitaria del genoma de tipo silvestre (1/2, 1/3, 1/4) con multímeros del cósmido que va a ser empaquetado dentro de una única cabeza de fago. Los multímeros pueden formarse dentro de la célula mediante recombinación entre cósmidos en una célula *rec*A$^+$, o pueden formarse durante el ciclo de replicación del bacteriófago (por ejemplo, replicación circular continua por el bacteriófago lambda).

El fago P2, o el fago 186 o el híbrido de 186 y P2, y su satélite, P4, proporcionan ventajosamente un cósmido de un tamaño manejable para las técnicas de clonación basadas en plásmidos (~ 11 kb) y la proteína terminasa de P2 tiene una preferencia por el empaquetamiento de sustratos de plásmidos que contienen una sola región *cos*, en lugar de multímeros lineales con regiones *cos* adyacentes, como prefiere la Lambda terminasa. Por lo tanto, se puede construir una biblioteca de cósmidos con facilidad y empacarla *in vivo* con alto grado de eficacia. Los métodos para el empaquetamiento de bibliotecas de genes utilizando un fago P2 se describen en Kahn y colaboradores (1991).

Las bibliotecas de fago elaboradas usando un bacteriófago lítico (por ejemplo, T7 Select) pueden ser empaquetadas *in vivo* después de la infección de una célula huésped. Cuando el fago es de lisis defectuosa, la célula permanecerá intacta hasta que sea permeabilizada y cribada por el método de la invención. El fago infeccioso puede ser luego recuperado de las células seleccionadas por tratamiento con lisozima para degradar el peptidoglicano y liberar las partículas de fago.

Las bibliotecas de fago elaboradas usando un bacteriófago lisogénico o sus cósmidos son empaquetadas *in vivo* mediante la inducción de activación de un profago integrado o mediante infección de un fago auxiliar para producir fagos y para ingresar en la ruta lítica. La inducción del profago se logra comúnmente utilizando mutantes sensibles a la temperatura de la proteína represora de la inmunidad del fago. Las bibliotecas se pueden establecer en la célula huésped a baja temperatura, y luego se induce el empaquetamiento del bacteriófago por un cambio de temperatura hacia arriba. Por ejemplo, el alelo *cI*857 del gen represor del fago lambda soporta el establecimiento y mantenimiento de lisogenia a 30ºC, pero es inactivo a temperaturas superiores a 37ºC, forzando la escisión del profago y la entrada a la ruta lítica. Sin embargo, el fago P2, que se conoce como un fago no inducible, no puede ser inducido por métodos estándar tales como UV o un represor sensible a la temperatura. Por el contrario, las funciones de P2 pueden ser inducidas como un fago auxiliar para el empaquetamiento de cósmidos mediante el uso de la infección del satélite P4, en particular, los mutantes *vir* de P4 que impiden el establecimiento de un colisógeno P2/P4, pero en vez de eso activan P2. Sin embargo, el fago relacionado con P2, 186, no tiene un represor sensible a la temperatura, *cIts*, que pueda inducir la replicación del fago y el empaquetamiento tras la inactivación (Woods y Egan (1974)). Además, el fago híbrido de P2 y 186 fueron obtenidos por infección conjunta que contiene el control de replicación inducible por temperatura del fago 186 con los genes estructurales de P2. Uno de estos fagos se conoce como Hy5 (Younghusband y colaboradores, 1975).

Los elementos de P2 y P4 que regulan la ruta lítica de P2 también pueden clonarse e inducirse para activar la lisis. El Ejemplo 17 detalla el uso de los factores de transcripción de los genes P4 δ, P2 cox y P2 ogr para inducir lisis y empaquetamiento de cósmidos en un colisógeno P2/P4 de la cepa C de *E. coli*. El fago lambda *cI*857 represor se utilizó con su promotor endógeno y la región del operador del gen *cro* para regular la expresión de los factores de transcripción de P2 y P4. El gen δ fue el activador más rápido de lisis, seguido por los genes *ogr* y *cox*, en ese orden. La lisis celular fue acompañada por la liberación del fago P4 infeccioso y partículas de cósmido.

Otros genes de control de P2 que pueden inducir la activación de P2 incluyen al operón completo *sid*-δ-*psu* de P4 y el antirrepresor P4ε, o combinaciones de los mismos.

Una biblioteca de cósmidos transformada en células que contienen un fago auxiliar P2 con un fago auxiliar P4 colisogénico y/o las regiones de control de P4 descritas anteriormente, pueden ser empaquetadas *in vivo* después de la inducción de la activación de P2. Cuando el fago es de lisis defectuosa, la célula permanecerá intacta hasta que sea permeabilizada y cribada por el método de la invención. Las partículas infecciosas del fago cósmido pueden ser luego recuperadas de las células seleccionadas por tratamiento con lisozima para degradar el peptidoglicano y liberar las partículas de fago.

Kits

Los componentes necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención pueden proporcionarse convenientemente en forma de un kit. Como lo comprenderá la persona experta en la técnica, los diversos componentes del kit pueden suministrarse en recipientes individuales o alícuotas, o los componentes de la solución se pueden combinar en

diferentes combinaciones y en diferentes concentraciones para conseguir un rendimiento óptimo de los métodos de la invención. Está dentro del conocimiento del experto en la técnica determinar qué componentes del kit pueden combinarse de manera que los componentes se mantengan en una forma estable antes de su uso.

Los kits, tal como se describen aquí, contendrán típicamente, como mínimo, un vector que comprende un sitio para insertar en el vector un polinucleótido que codifica un primer polipéptido y un marco de lectura abierto que codifica un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido para formar un complejo proteico que se retiene dentro o se une a la pared celular de una célula bacteriana permeabilizada. Preferiblemente, el kit también contiene un agente para permeabilizar una célula bacteriana. En una realización, el kit comprende además células bacterianas, preferiblemente células bacterianas Gram negativas. Otros componentes adicionales pueden ser incluidos con el kit u otros componentes suministrados por el usuario final, si es necesario.

La memoria descriptiva también proporciona kits adecuados para su uso en métodos de cribado de una proteína para una actividad deseada que utiliza un fago de lisis defectuosa. Dichos kits comprenderán típicamente al menos una bacteria Gram negativa que comprende un fago de lisis defectuosa junto con una proteína represora de fago sensible a la temperatura y/o un polinucleótido que codifica una o más proteínas activadoras de fagos. En una realización, el kit comprende un fago de lisis defectuosa seleccionado de P2, 186, Hy5 y/o P4. En otra realización, el kit comprende un fago lambda de lisis defectuosa. El kit puede comprender opcionalmente un agente para permeabilizar una célula bacteriana Gram negativa.

Ejemplos

Ejemplo 1. Cribado de detergentes que permeabilizan *E. coli*

Para identificar los detergentes que permeabilizarían las células de *E. coli* se cribaron una cantidad de detergentes, tanto iónicos (Ácido n-dodecil-β-iminodipropiónico, cloruro de deciltrimetilamonio, decanoil sarcosina de sodio, anzergente 3-10) como no iónicos (óxido de dimetiloctilfosfina [Apo8], óxido de dimetildecilfosfina, n-octil-β-D-tioglucopiranósido [8TGP], monodecanoato; de sacarosa; Mega 10; Tween 80; Triton X-100; Triton X-114), ambos para la absorción del colorante impermeable a la membrana, Gel Red (Biotium, cat. No. 41002) y para la liberación de GFP. Los detergentes probados para permeabilización fueron adquiridos a través de Anatrace.

La cepa huésped de *E. coli* utilizada en todos los experimentos reportados fue la línea celular *Argentum* derivada de K12 (Alchemy Biosciences) (ΔmcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ΔendA lacZΔM15). Sin embargo, también se ensayó el método según una realización de la invención, con resultados comparables, con BL21 derivada de la cepa B (F-dcm ompT hsdS (r_B- m_B-) gal) y con la cepa de clonación K12 DH5α (F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17 (r_K^- m_{K+}), λ-).

La GFP se clonó en un vector de alto número de copias inducible por arabinosa (pAra1::GFP5). La expresión procedía de un cultivo fuertemente inoculado de una placa con colonias recién estriadas. El cultivo se desarrolló a 37°C hasta una OD600 de -0,3 cuando se indujo la expresión mediante la adición de arabinosa hasta una concentración final de 0,2%. El cultivo inducido se agitó a 25°C durante 2 horas antes de la recolección.

Las células se sedimentaron a partir de 1 mL de cultivo inducido por centrifugación y se permeabilizaron mediante suspensión en 300 µL de detergente al 0,5% en LB y se incubaron a 25°C durante 10 minutos. Las células permeabilizadas se sedimentaron y resuspendieron en 1X Gel Red en agua durante 2 minutos antes de ser sedimentadas y lavadas una vez en 300 µL de TBS. Se suspendieron en 300 µL de TBS y se procesaron para microscopía de fluorescencia mediante la adición de DABCO/glicerol (0,0325 g de DABCO disuelto en 900 µL de glicerol + 100 µL de PBS).

Las muestras se observaron ya sea en un microscopio óptico Olympus Provis AX70 con una cámara deslizante (SPOT RT 2.3.0 Software versión 4.6), o en un microscopio confocal láser de barrido Leica TCS SP2/Microscopio invertido Leica DM IRE2 (Leica Confocal Software versión 2.0).

La Figura 1 muestra el resultado de la permeabilización con detergente con *E. coli* que expresa GFP. Mientras que las células no tratadas son verdes (GFP), las células que han sido permeabilizadas pierden su GFP interna y toman la coloración Gel Red de unión al ADN. Mientras que el nonidet-40 muestra alguna permeabilización, Apo8 y Mega10 muestran una mayor proporción de células que han sido permeabilizadas. Una mezcla de estos dos detergentes al 0,5% cada uno, denominada Agente 86, demostró una permeabilización casi completa, al igual que otro detergente, n-octil-β-D-tioglucopiranósido (8TGP). Mega10, Apo8 y 8TGP son todos detergentes no iónicos, que son menos perturbadores que los detergentes iónicos para el plegamiento y función de las proteínas.

Como la pared celular permaneció intacta después de la permeabilización, los extractos proteicos solubles del sobrenadante de la permeabilización con detergente descritos anteriormente se analizaron mediante SDS-PAGE. Se añadió también lisozima de clara de huevo de gallina (Boehringer Mannheim; 837 059) hasta una concentración final de

2 mg/ml a una muestra de las células que se permeabilizan para remover la pared celular y liberar las proteínas celulares totales. Se añadió luego colorante de carga para SDS-PAGE con β-mercaptoetanol a las muestras, que se desnaturalizaron a 95ºC durante 2 minutos. Se cargaron 20 µL de muestras en SDS-PAGE al 9% y se tiñeron/fijaron con Azul Brillante de Coomassie / metanol / ácido acético.

La Figura 2 muestra que la liberación de proteína soluble se correlaciona directamente con la liberación de GFP y la incorporación de Gel Red como se observa mediante microscopía. Significativamente, hubo diferencias entre la liberación de proteína de células con paredes celulares intactas en comparación con aquellas cuyas paredes celulares se removieron usando lisozima, con las células encapsuladas en la pared celular liberando proteína soluble hasta un tamaño de ~ 120 kD. Este es presumiblemente el tamaño de corte por encima del cual las proteínas globulares son incapaces de salir de la célula a través de los poros de la red del peptidoglicano que constituye la pared celular de las eubacterias Gram negativas.

Ejemplo 2. Cribado para soluciones de permeabilización que retienen el ADN huésped

Si el método de la invención se va a utilizar para cribar bibliotecas de genes para variantes de proteínas con propiedades mejoradas, debe permanecer un enlace entre la proteína expresada y su ácido nucleico codificante. A medida que la etapa de permeabilización de la membrana elimina la barrera que impide la pérdida del ADN a través de la pared celular, se examinaron las condiciones para la permeabilización que podrían reducir o prevenir la pérdida del ADN del huésped.

La permeabilización de células utilizando 8TGP al 0,5% se llevó a cabo en diferentes medios y se examinó la pérdida de ADN mediante microscopía de fluorescencia utilizando el colorante de unión al ADN, Gel Red.

Se ensayaron composiciones de medio de permeabilización (todos los medios con 8TGPal 0,5%):

Medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro)

Medio LB [sal] (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura por litro)

Tris 50 mM, pH 7,5

Hepes 50 mM, pH 7,0

NaCl 170 mM

NaCl 250 mM

Tris 25 mM, pH 7,5 + PEG 6000 al 1,5% (p / v)

Tris 50 mM, pH 7,5 + PEG 6000 al 3% (p / v)

Tris 50 mM, pH 7,5 + NaCl 170 mM

Tris 50 mM, pH 7,5 + NaCl 250 mM

Se identificó un medio óptimo para la permeabilización como medio LB bacteriano. De acuerdo con esto, de aquí en adelante se realizó la permeabilización utilizando ya sea 8TGP al 0,5% en LB o Agente 86 en LB (Mega10 al 0,5% y Apo8 al 0,5% en LB).

Ejemplo 3. Fusiones de proteína con un andamiaje de tetrámero

Como se observó por los experimentos descritos en el Ejemplo 1, las proteínas de tamaño superior a ~ 120 kD se retuvieron dentro de células permeabilizadas de *E. coli* por la pared celular. Por lo tanto, se razonó que una proteína de interés que era menor de 120 kD se mantendría dentro de la cápsula de la pared celular si, por fusión a una pareja de proteínas, se pudiera hacer que el tamaño total supere los 120 kD.

Por consiguiente, se clonaron 6 proteínas tetraméricas diferentes a partir de *E. coli* para uso como socios de fusión. Estas fueron β-gal, BetB, G5K, GshB, RhnA y YdcW, que tenían tamaños monoméricos de 116 kD, 52 kD, 39 kD, 35 kD, 47 kD y 50 kD, respectivamente.

Se construyó un vector de alto número de copias inducible por arabinosa para expresión tetramérica. La etiqueta SNAP (NEB / Covalys), un dominio de 20 kD que se une covalentemente a un sustrato fluorescente, se clonó secuencia arriba

de los genes tetrámeros y se usó como reportero de expresión. También se incluyó un epítopo 6 x His en el extremo del terminal N de la proteína de fusión para facilitar la purificación o detección.

La secuencia del vector de arabinosa, pAra3::His6::SNAP, se proporciona como la SEQ ID NO: 1.

La expresión de la proteína de fusión se indujo con la adición de arabinosa al 0,2% y el cultivo se incubó a 25ºC durante 2 horas.

Para permeabilizar las células para expresión de proteínas mediante el método de acuerdo con una realización de la invención, el protocolo fue el siguiente:

1. Precipitar 1 ml de células por centrifugación

2. Resuspender las células en 300 µl de 8TGP al 0,5% / LB

3. Incubar a 25°C durante 10 minutos

4. Precipitar células mediante centrifugación

5. Resuspender las células en 200 µl de TBS o LB

Para marcar el dominio informador de expresión SNAP con los colorantes SNAP impermeables a la membrana (Covalys / New England Biolabs), el protocolo fue el siguiente:

1. Disolver 20 nmol de BG-488 (colorante verde) o BG-547 (colorante rojo) en 300 µl de DMSO en forma de un patrón 200x

2. Añadir 1 µl de patrón 200x a 200 µl de células permeabilizadas suspendidas en TBS o LB

3. Incubar a 25°C durante 15 minutos

4. Lavar las células dos veces mediante sedimentación por centrifugación y resuspender en 300 µL de TBS

Para observar las proteínas de fusión tetraméricas mediante microscopía de fluorescencia para retención dentro de la cápsula celular permeabilizada, el protocolo fue el siguiente:

1. Dejar caer 20 µL de suspensión de células sobre una lámina de vidrio para microscopio, cubrir con cubreobjetos y sellar los bordes con esmalte de uñas (montaje húmedo); alternativamente, dejar que la gotita de las células se seque casi por completo, dejar caer 20 µL de DABCO / glicerol en la parte superior, cubrir con cubreobjetos y sellar los bordes con esmalte de uñas (montaje en seco)

2. Visualizar la muestra utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus o Leica

La expresión de la proteína de fusión de longitud completa se confirmó mediante transferencia tipo Western de extractos de proteína corridos en geles SDS-PAGE y se probaron con anticuerpo α-His6. Todos los constructos tetraméricos expresados en *E. coli* a niveles detectables (Figura 3A).

La microscopía de fluorescencia de las proteínas de fusión tetraméricas expresadas en *E. coli* encontró que β-gal y G5K tenía cuerpos de inclusión significativos y baja fluorescencia, presumiblemente debido a dificultades en el plegamiento de la proteína de fusión. Sin embargo, como se muestra en la Figura 4, la expresión de la proteína de fusión, según se juzgó por fluorescencia SNAP, fue buena para GshB, y excelente para RhnA, BetB y YdcW. Se observó que la distribución de la proteína de fusión en la célula huésped permeabilizada no era homogénea, con focos evidentes tanto por microscopía de campo brillante como por fluorescencia. Sin embargo, como el sustrato de SNAP fluorescente no estaría unido por un dominio mal plegado, y como la señal era muy intensa, se cree que estos cuerpos son probablemente agregados de proteína plegada, y no cuerpos de inclusión de proteína no plegada que se observan frecuentemente cuando sobreexpresan proteínas en *E. coli*.

Las fusiones de SNAP::tetrámero también tenían un epítopo His6 en el extremo terminal N. Para probar si una molécula grande tal como un anticuerpo sería capaz de penetrar a través de la estructura de la red de la pared celular de *E. coli* se probaron las células permeabilizadas con anticuerpo αHis para detectar la fusión de SNAP::tetrámero.

1. La expresión y permeabilización de la fusión del andamiaje His6::SNAP::BetB se realizó como se describió anteriormente.

2. La marcación con el ligando de SNAP BG-547 se realizó como se describió anteriormente.

3. 200 µl de células marcadas con SNAP permeabilizadas, se lavaron tres veces en LB y se dejaron sedimentar sobre un cubreobjetos recubierto con polietilenimina (PEI). Se eliminó el exceso de medio celular por aspiración y se dejaron secar al aire los portaobjetos.

4. Se bloquearon las células durante una hora en regulador de bloqueo (BSA al 1%, gelatina de pescado de agua fría al 1% (Sigma, G7765), Azida al 0,02% en PBS-Tween20).

5. Las células se incubaron durante la noche a 25°C en anticuerpo primario αHis (Abcam, AB9136-100), diluidas 1:10 en regulador de bloqueo.

6. Las células se lavaron 3 veces en PBS-Tween20 (10 min cada vez).

7. Las células se incubaron en anticuerpo secundario diluido 1: 2.000 (Molecular Probes, A11015) en regulador de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

8. Las células se lavaron 3 veces en PBS-Tween20.

9. Se montaron en DABCO / glicerol y se observaron bajo el microscopio confocal Olympus.

La Figura 5 muestra que el anticuerpo αHis se localiza conjuntamente con el ligando fluorescente SNAP dentro de la cápsula de la pared celular, indicando que los poros de la pared celular son lo suficientemente anchos para permitir la difusión de una proteína relativamente grande en el volumen interno de la cápsula. De este modo, incluso pueden usarse ligandos proteicos muy grandes como sustratos de afinidad para proteínas de afinidad expresadas en el citoplasma de acuerdo con una realización del método de la invención.

El compañero de fusión SNAP y el informador de expresión se compararon con la proteína HALO (Promega) en un intento de ver si la formación de los cuerpos subcelulares se alteraba. La proteína HALO se une covalentemente a un sustrato fluorescente impermeable a la membrana (Alexa flúor 488; G1001, Promega) de forma similar a SNAP. El gen informador HALO se clonó en marco directamente en el lugar del gen SNAP en los constructos de expresión tetraméricos. La expresión de las proteínas de andamiaje HALO::tetraméricas se compararon con las variantes de SNAP. La marcación de las células HALO permeabilizadas se llevó a cabo esencialmente como se describe para SNAP, y siguiendo las instrucciones del fabricante. La Figura 6 muestra que se encontró que los patrones de expresión de los HALO::tetrámeros y de los SNAP::tetrámeros eran similares, con la excepción de que la proteína de fusión HALO::RhnA era fraccionalmente más soluble que la fusión SNAP::RhnA, con menos células conteniendo focos fluorescentes.

Por lo tanto, la expresión de una proteína como una fusión a un andamiaje tetramérico (en este ejemplo, SNAP o HALO), y luego permeabilizar de la célula huésped de *E. coli* con un detergente adecuado permite la retención de la proteína de interés dentro de la pared celular.

Ejemplo 4. Proteínas de unión al ADN como andamiaje celular

Para acoplar el fenotipo al genotipo, la célula huésped debe retener al menos algún ADN episomal después de la permeabilización y a lo largo del cribado funcional. Habiendo identificado las condiciones de permeabilización que retenían el ADN genómico del huésped, así como el ADN plasmídico, se razonó que el ADN podría usarse como un andamiaje de retención para la proteína de interés expresada.

Por lo tanto, se clonó una pequeña proteína de unión al ADN (DBP) de hélice-horquilla-hélice de alta afinidad (80 aa) del gen *ComE* de *Neisseria gonorrhoea* (Chen y Gotschlich, 2001) y se fusionó con el extremo terminal C de GFP en un constructo inducible por arabinosa (pAra3::GFP::DBP, seq 2).

La expresión por inducción de arabinosa se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1. Las células se permeabilizaron y se prepararon para microscopía de fluorescencia como se describe en los Ejemplos 1 y 3.

La Figura 7 muestra que la fusión de GFP::DBP (verde) se conservó en células permeabilizadas y se colocalizó con el colorante de unión al ADN, Gel Red (rojo).

Por lo tanto, expresar una proteína como una fusión a una proteína de unión de ADN no específica de alta afinidad, y luego permeabilizar la célula huésped de *E. coli* con un detergente adecuado permite la retención de la proteína de interés dentro de la cápsula celular.

Ejemplo 5. Retención de ADN en células permeabilizadas

Para demostrar la retención de ADN, tanto genómico como episomal, dentro de la cápsula celular después de la permeabilización, se prepararon células que expresan GFP5::DBP y His6::eGFP para microscopía de fluorescencia y extracción de ADN plasmídico.

Después de la inducción, las células se permeabilizaron, luego o bien se congelaron o se dejaron en TBS a 37ºC con agitación durante la noche. Todas las muestras se procesaron al día siguiente para cualquier microscopía de fluorescencia, para visualizar la GFP y el contenido de ADN de la cápsula mediante el colorante Gel Red de unión al ADN, o se llevó a cabo una preparación de ADN plasmídico.

La microscopía de fluorescencia se realizó como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 8 muestra que tanto el ADN de la célula huésped (rojo) como el GFP5::DBP (verde) se mantuvieron en la cápsula celular inmediatamente después de la permeabilización y también con la incubación durante la noche a 37ºC, sin ninguna pérdida aparente. La proteína His6::GFP se perdió de las células después de la permeabilización, pero el ADN de la célula huésped (rojo) se conservó después de la permeabilización, y también durante la noche, de nuevo sin pérdida aparente.

Para confirmar que el ADN plasmídico, y no sólo el genoma del huésped, se mantuvo dentro de las células permeabilizadas, se llevaron a cabo minipreparaciones de plásmido sobre muestras preparadas de forma idéntica.

El ADN de plásmido de 1 ml de células tratadas con detergente o no tratadas se preparó mediante un protocolo de lisis alcalina de minipreparaciones de plásmido. El ADN de plásmido liberado en el sobrenadante de la extracción con detergente se extrajo utilizando una columna y solución Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf; 955152051), siguiendo el protocolo del fabricante.

La cantidad total de cada muestra se cargó en un gel de agarosa al 1% y se formó una imagen en una película FujiFilm LAS-3000 Inteligent Darkbox usando el software LAST-3000 de lector de imágenes y el software Multi Gauge versión 3.0.

La Figura 9 muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio con regulador TAE con muestras de ADN plasmídico de ambas líneas celulares.

El carril 1 de la Figura 9 es el ADN plasmídico total en células no tratadas. El carril 2 es el sobrenadante de la etapa de permeabilización y el carril 3 es el plásmido retenido en la cápsula celular después de la permeabilización. Se observa que hay muy poca liberación de plásmido en el sobrenadante con permeabilización, a pesar de la pérdida completa de la proteína His6::GFP soluble observada en la Figura 8. Por lo tanto, el ADN plasmídico está casi completamente retenido por la pared celular y puede usarse en el método de acuerdo con una realización de la invención para el enlazamiento del genotipo con el fenotipo en cribados para variantes mejoradas de proteínas.

Confirmando los datos de microscopía, la incubación durante la noche no reveló ninguna pérdida de ADN plasmídico después de una incubación durante la noche a 37ºC de células permeabilizadas suspendidas en TBS (carril 5).

Ejemplo 6. Andamiaje de unión al peptidoglicano

Otra estructura celular que se retiene después de la permeabilización de la membrana es la pared celular, que está compuesta por un polímero reticulado de peptidoglicano (PG).

Para unir PG no covalentemente, se clonó un dominio de unión a PG de 70aa a partir del fago φKZ de pseudomonas (KzPG) que se mostró previamente que estaba bien expresado en *E. coli* y se unió a la pared celular con alta afinidad ($K = 3 \times 10^7\ M^{-1}$) (Briers y colaboradores, 2009). Como un cribado para proteínas de afinidad se esperaría identificar variantes que tienen afinidades aún más altas para sus objetivos que el dominio de unión a KzPG para PG, se necesita aumentar la afinidad de la proteína de unión al andamiaje. Para aumentar la afinidad de la unidad estructural de unión al andamiaje, se enlazaron tanto el dominio de unión al ADN de *ComE* (DBD) como el dominio de unión a PG en la misma proteína de fusión. Por lo tanto, la constante de disociación final de la proteína de fusión de ambos andamiajes (PG o ADN) debe ser cercana a un múltiplo de cada constante de velocidad.

Por lo tanto, se construyó un vector de expresión pAra3::His6::KzPG::SNAP::DBP (SEQ ID NO: 2). Se indujo la expresión como se describe en el Ejemplo 1 y se prepararon células para microscopía de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 3. La expresión y distribución de la proteína de fusión se controló mediante marcación con SNAP, como se describe en el Ejemplo 3.

Se observó fluorescencia en la periferia de la célula, en el área de la pared celular y en un nivel inferior en un área difusa dentro del volumen unido a la pared celular de la cápsula.

Otra realización de la invención sería unir covalentemente la proteína de interés a un andamiaje celular antes de la permeabilización. Para lograr esto, se utilizó una fusión de proteínas a LPP, una proteína abundante de *E. coli* que

forma una bobina trimérica en espiral en el periplasma. En su forma nativa, un extremo está atado a la membrana externa por medio de lipidación y el otro está unido covalentemente a la pared celular a través de una lisina del extremo terminal C.

Se construyó un constructo de expresión que fusiona la secuencia señal dirigida al OmpF periplásmico con el informador de expresión de SNAP, seguido por la secuencia de LPP de 57 aa de *E. coli* que carece de la secuencia señal del extremo terminal N y la cisteína requerida para la unión a la membrana externa. El vector de expresión pAra3::OmpF::SNAP::LPP (SEQ ID NO: 3) se indujo con arabinosa, como se describe en el Ejemplo 1, y se prepararon células para microscopía de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 3. La expresión y distribución de la proteína de fusión se controló mediante marcación con SNAP, como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 10 muestra que la distribución de la proteína de fusión LPP era irregular a través de la superficie de la pared celular, con áreas de fluorescencia intensa y áreas ausentes de cualquier fluorescencia. Sin embargo, en casi todos los casos, se marcaron los polos de las células.

Ejemplo 7. Expresión de una proteína de afinidad αGFP usando un andamiaje de proteína tetramérica

Para demostrar una realización del método de la invención tal como se aplica a proteínas de afinidad, se clonó un anticuerpo de dominio único generado a partir de un inmunizado de Llama contra eGFP en los vectores de andamiaje celular. Debe observarse que, de las dos secuencias enumeradas en la solicitud de patente para el anticuerpo αGFP (WO 2007/068313), sólo se encontró que la variante R35 era funcional (αGFP-R35; Protein Database ID 3K1K). Por lo tanto, esta secuencia se utilizó para todas las pruebas experimentales.

El gen αGFP-R35 se clonó como una fusión en el extremo terminal N al andamiaje tetramérico pAra3::HALO::FLAG::RhnA para crear el vector pAra3::αGFP (R35)::HALO::FLAG::RhnA (SEC ID No: 4).

También se construyó un vector pAra3::His6::eGFP para producir una proteína de fusión His6::eGFP como el sustrato objetivo del anticuerpo. La proteína His6::eGFP se indujo como se describe en el Ejemplo 1. La proteína soluble se liberó a partir de células usando 8TGP al 0,5%, se purificó mediante IMAC usando resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen; 30230). Se eluyó His6::eGFP a partir de la resina Ni-NTA en regulador NTTW + imidazol (NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, Tween20 al 0,1% + imidazol 200 mM).

La expresión de la proteína de fusión anticuerpo::tetramérica y la permeabilización de las células huésped se llevó a cabo como se describe en los Ejemplos 1 y 3.

Para la unión de αGFP a eGFP en cápsulas celulares permeabilizadas, el sedimento de la cápsula se suspendió en 300 µl de eGFP y se dejó equilibrar durante 20 minutos a 25ºC, momento en el que las cápsulas se precipitaron por centrifugación, se lavaron una vez en 300 µl de TBS, y luego se resuspendieron en TBS. La microscopía de fluorescencia en cápsulas de αGFP / eGFP se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 11 muestra que las cápsulas permeabilizadas que expresan la proteína de fusión αGFP::HALO::RhnA unen eGFP a través de la célula, aunque parecían ser focos de coloración más intensa que se pueden correlacionar con los focos observados en la Figura 5 con la marcación del ligando HALO.

Por lo tanto, el anticuerpo αGFP de Llama se expresa funcionalmente en el citoplasma y, además, se retiene dentro de la cápsula después de la permeabilización con detergente.

La marcación con anticuerpo αHis descrito en el Ejemplo 3 y observado en la Figura 5 ya demostró que una proteína mayor de ~ 150 kD es capaz de difundirse a través de la pared celular permeabilizada en el interior de la cápsula. Sin embargo, los anticuerpos nativos son proteínas de forma irregular con 3 dominios de tamaño aproximadamente igual separados por una región de bisagra flexible. Por lo tanto, el radio efectivo que estas proteínas pueden presentar puede ser de una proteína globular mucho más pequeña. Sin embargo, la GFP, que tiene una estructura de barril β y un tamaño molecular de ~ 27 kD, es una proteína simétrica con un radio proporcional a su tamaño, que fue capaz de pasar a través de las paredes celulares de la cápsula permeabilizada para ser unida por el anticuerpo αGFP interno.

Por lo tanto, el método de la invención puede usarse para expresar proteínas de afinidad en el citoplasma de *E. coli* para el uso en la expresión de bibliotecas de afinidad para unión de objetivos simétricos de al menos 30 kD.

Ejemplo 8. Expresión de una proteína de afinidad αGFP usando un andamiaje de proteína de unión al ADN y a PG

Se demostró adicionalmente una realización del método de la invención usando el anticuerpo de camélido αGFP fusionado a los dominios de unión de ADN y a PG.

La expresión de la proteína de fusión de anticuerpo::KzPG::SNAP::DBP, permeabilización de células huésped y marcación con His6::eGFP se llevó a cabo como se describe para el Ejemplo 6.

Se utilizaron montajes tanto en húmedo como en seco para formar imágenes de la unión de eGFP mediante la proteína de fusión αGFP. La Figura 12 muestra que hubo diferencias significativas con la fluorescencia de GFP entre los dos métodos diferentes de formación de imágenes. Las células montadas en seco (DABCO / glicerol) tuvieron principalmente fluorescencia interna, con una fusión entre el campo claro y la marcación con eGFP que demuestra que la región alrededor de la pared celular no era más intensa que el volumen interno (Figura 12B). Sin embargo, las células montadas directamente en TBS tenían un patrón distintivo de un borde exterior de fluorescencia fuerte que parece ser la eGFP unida a la pared celular con una señal interna más débil (Figura 12A). Sin estar limitado por la teoría, se especula que el entorno del disolvente DABCO / glicerol, que es viscoso y no acuoso, evita la interacción entre el dominio KzPG con la pared celular de peptidoglicano, pero no evita la unión de αGFP con eGFP, o de DBP con ADN.

Sin embargo, como los procedimientos de cribado para proteínas o enzimas de afinidad casi siempre se llevarán a cabo en ambientes acuosos, la distribución de la proteína de fusión de afinidad se aproximará al montaje en húmedo unido a la pared celular observado en la Figura 12A.

Ejemplo 9. Expresión de una proteína de afinidad αGFP mediante unión covalente a la pared celular

Una realización del método de la invención se demostró adicionalmente enlazando covalentemente el anticuerpo αGFP a la pared celular.

El anticuerpo αGFP se clonó como una fusión inducible de arabinosa secuencia abajo de la secuencia señal OmpF y secuencia arriba de las secuencias SNAP y LPP.

Tras la inducción de la expresión por arabinosa, la secuencia señal OmpF dirigirá la proteína naciente a través de la membrana celular interna dentro el periplasma y será escindida cuando pase a través del poro de la membrana.

En el periplasma, se espera que el dominio LPP forme una bobina trimérica en espiral con otros dos compañeros, ya sea proteínas de fusión LPP de tipo silvestre o con otras proteínas de fusión αGFP. El residuo del extremo terminal C del dominio LPP es una lisina que está covalentemente enlazada a la pared celular de *E. coli* a través del grupo amino ε, lo más probablemente por la L, D-transpeptidasa YbiS (Magnet y colaboradores, 2007).

La expresión de la proteína de fusión OmpF::αGFP::SNAP::LPP, la permeabilización celular y la marcación con eGFP se realizó como se describe para el Ejemplo 8.

La Figura 13 muestra que eGFP se unió de manera desigual, pero intensamente, alrededor de la pared celular (Figura 13B). EGFP no se unió a las células que expresan la fusión OmpF::SNAP::LPP fusión sin el dominio αGFP (Figura 13A).

La unión covalente de la fusión OmpF::SNAP::LPP a la pared celular se demostró marcando primero las células permeabilizadas que expresan la proteína de fusión con un ligando de SNAP antes de calentar una muestra de cápsulas de células marcadas a 95ºC durante 5 minutos . La Figura 14 demuestra que la fluorescencia del ligando de SNAP que marca la pared celular no cambió entre la muestra tratada térmicamente y un control que no se calentó. La tinción con Gel Red también demostró que el ADN genómico estaba todavía retenido en la célula, incluso en la muestra tratada térmicamente.

Ejemplo 10. Experimentos de permeabilización de la membrana externa

En una realización adicional de la invención, la membrana externa puede ser selectivamente permeabilizada por objetivos ligandos, tales como, por ejemplo, sustratos o polipéptidos enzimáticos, conservando al mismo tiempo el polipéptido que está siendo cribado ya sea dentro o unido a la pared celular.

Para identificar las condiciones que permeabilizarían selectivamente la membrana externa, se cribó una gama de detergentes y reguladores. Se usaron ligandos tanto grandes (eGFP) como pequeños (Gel Red) para determinar si la permeabilización de las membranas externa/interna generaron ya sea poros de membrana grandes o pequeños.

Se cultivaron cepas de *E. coli* que expresan OmpF::αGFP::SNAP::LPP inducida por arabinosa (unida a la pared celular) o αGFP::HALO::FLAG::RhnA (citoplasmática) y se indujeron como se describe para el Ejemplo 1.

Se lavó 1 ml de cultivo inducido una vez en Tris 50 mM (pH 8) antes de ser suspendido en variantes del regulador de permeabilización que contenía detergente 0,2 - 0,4% ya sea en Tris 25 mM + EDTA 1 mM (pH 8) o en Tris 25 mM + Ca^{2+} 2 mM (pH 8) y se incubó a 25°C durante 10 minutos.

Se lavaron las células permeabilizadas una vez en regulador apropiado y luego se tiñeron con Gel Red (1 vez en agua) y se lavaron con TBS. Luego se incubaron con His6::eGFP purificada durante 1 hora a 25ºC antes de ser sedimentadas por centrifugación y resuspendidas en TBS y se observaron mediante microscopía de fluorescencia como un montaje en húmedo.

Las Figuras 15 y 16 demuestran que Apo8 (A) al 0,2% o el Tween20 (B) en regulador Tris/Ca^{2+} o Tris/EDTA permeabilizaron selectivamente la membrana externa permitiendo la permeación de un ligando grande (eGFP) a través de la membrana externa, pero no a través de la membrana interna. El ligando más pequeño Gel Red de unión al ADN, impermeable a la membrana, fue parcialmente permeable al citoplasma en la mayoría de las muestras, lo que indica que ocurrió algún grado de formación de poros en la membrana interna en algunas células. Sin embargo, el grado de unión de Gel Red se redujo mucho en comparación con las muestras que habían sido tratadas con los detergentes 8TGP al 0,5% o Agente86 donde tanto las membranas externa como interna fueron completamente permeables a eGFP.

Ejemplo 11. Clasificación por fluorescencia y análisis de expresión encapsulada

Como plataforma de expresión celular, el método de la invención es idealmente adecuado para clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS) para identificar clones de unión al ligando. Para probar la estabilidad de las células de *E. coli* permeabilizadas para la clasificación por FACS, se indujeron tres poblaciones para expresión: i) eGFP; ii) αGFP::KzPG::SNAP::DBP; y iii) His6::SNAP::BetB.

Las células que expresan αGFP no fueron permeabilizadas y fueron un control positivo para la fluorescencia en células de *E. coli* intactas. Las células que expresan αGFP::KzPG::SNAP::DBP fueron permeabilizadas de acuerdo con una realización del método de la invención, y fueron marcadas con el ligando BG-488 de SNAP (verde). Las células que expresan His6::SNAP::BetB fueron permeabilizadas de acuerdo con una realización del método de la invención, y fueron marcadas con el ligando BG-547 de SNAP (rojo).

Se suspendieron las células en PBS y se mezclaron en cantidades aproximadamente iguales para clasificación de poblaciones mixtas o clasificadas por separado para calibración de la señal. La clasificación celular se realizó en un FACS de afluencia de Becton Dickson. El análisis de los datos se realizó mediante el software FlowJo. Los parámetros para clasificación de *E. coli* fueron determinados por el operador.

La Figura 17 demuestra que las tres poblaciones fueron identificables por fluorescencia. Un nuevo análisis de las poblaciones clasificadas mostró que la clasificación proporcionó poblaciones relativamente puras de cada una. Las señales presentes en la región de baja fluorescencia del gráfico se demostró posteriormente que era ruido inherente en la señal y fueron removidas posteriormente por el operador mediante correcciones del instrumento.

Ejemplo 12. Selección de la región espaciadora para unión al soporte sólido

Las células que expresan la proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP fueron permeabilizadas usando medios 8TGP, y las células unidas a perlas de sefarosa de HisPur Co^{2+} (Thermo Scientific) a través de un compuesto intermedio eGFP etiquetada con His6. Las células o perlas fueron incubadas primero con un exceso de His6-eGFP antes de ser lavadas en TBS y luego incubadas juntas durante 30 minutos a 25ºC. Las células no unidas fueron luego retiradas mediante lavado de las perlas antes de que se evaluara el grado de la unión a las perlas mediante microscopía de fluorescencia.

Inicialmente no se detectó unión de la proteína de fusión αGFP::KzPG::SNAP::DBP a las perlas de sefarosa. Se teorizó que el dominio de unión de αGFP puede estar muy cerca a la pared celular para alcanzar la αGFP complejada con cobalto en la resina de sefarosa. Por consiguiente, se clonó un dominio espaciador peptídico de 12 residuos con codones aleatorios entre el dominio de unión de αGFP y el dominio de unión del peptidoglicano KzPG (GGT ACC gcy gcy gkk wtb gck wtb gkk gkk gck gkk gcy gcy GGT CTG (SEQ ID NO: 5)

Se expresó una biblioteca pequeña(-2.000 miembros) de las variantes espaciadoras y luego se unió a Sefarosa Co^{2+}, como se describió anteriormente. Se observó que una proporción de la biblioteca se unía a las perlas. Estos clones fueron amplificados luego por PCR, clonados nuevamente y se analizaron individualmente una docena de clones para unión y secuenciación. Se encontró que una variedad de espaciadores peptídicos eran a la vez resistentes a la escisión proteolítica (manteniendo altos niveles de αGFP en la proteína de fusión) así como permitiendo la unión de las células tratadas con detergente a las perlas de sefarosa como se demuestra en la Figura 18. Las secuencias espaciadoras que resultaron ser funcionales para la unión al soporte se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Espaciadores enlazadores aleatorios (RL) para unión al soporte sólido

Enlazador	Secuencia de aminoácidos

RL1	GSNSNNQSKPSS (SEQ ID NO: 6)
RL2	GGPRNPQRHTGS (SEQ ID NO: 7)
RL6	SGTRHHNSHNSS (SEQ ID NO: 8)
RL9	SSNRTHKSNNSS (SEQ ID NO: 9)
RL10	SGHRTTERKHSS (SEQ ID NO: 10)
RL13	GGHRHTQRHNGG (SEQ ID NO: 11)
RL14	GGPRTPQSQPSG (SEQ ID NO: 12)

Se seleccionó una secuencia espaciadora, RL6, fue escogida para estudios de unión adicionales. Se examinaron otros factores que contribuyen a una unión fuerte con matrices de soporte sólidas. Se encontró que tanto el tiempo de incubación de las células con la matriz como la concentración de sal (NaCl) de la solución de unión tienen efectos positivos en la unión. Se encontró que una incubación de 30 minutos y un intervalo de concentraciones de NaCl de 200 mM a 500 mM fueron efectivos aunque se consideró óptimo 300 mM. La unión fue efectiva en una gama de reguladores, incluyendo soluciones tris, fosfato y MOPS reguladas con sal 300 mM.

También se confirmó que las condiciones de unión para células que expresan la proteína de fusión αGFP::RL6::KzPG::SNAP::DBP con las nanopartículas magnéticas de estreptavadina (MagneSphere; Roche diagnostics) a través de eGFP biotinilado se confirmó también que estaban dentro de los intervalos identificados para la unión a perlas de sefarosa y demostradas por la Figura 19.

Además de los espaciadores de 12 residuos, también se consideraron dominios de proteínas para uso como dominios espaciadores. El dominio pequeño, de la inmunoglobulina 27 estable y altamente expresado del gen de titina humana (127) se clonó secuencia arriba del espaciador RL6. También se encontró que este dominio permitía una expresión alta y estable del dominio αGFP del extremo terminal N así como una excelente unión a la matriz sólida (Figura 19).

Ejemplo 13. Construcción de una biblioteca de scFv de ratón para expresión encapsulada

La estructura de dominio final para la expresión intracelular de una biblioteca de anticuerpo monocatenario (scFv) fue: scFv::I27::RL6::KzPG::SNAP::DBP. Las secuencias de proteína y ADN de la proteína de fusión sin el dominio scFv se proporcionan como las SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. Esta fusión proteica tiene la scFv en el extremo terminal N, seguido por los dos dominios espaciadores, I27 y RL6, luego el dominio de unión de peptidoglicano, KzPG, el dominio informador de SNAP y, finalmente, el dominio de unión al ADN (DBP).

El ADNc cebado al azar fue producido a partir de ARN total de bazo de ratón usando la enzima Superscript III (Invitrogen). A partir de este ADNc, se amplificaron los dominios variables de cadena ligera (V_L) y de cadena pesada (V_H) de scFv utilizando ADN polimerasa Vent (New England Biolabs) y cebadores oligonucleotídicos degenerados para las secuencias de la familia de anticuerpos de ratón, como lo describen Schaefer y colaboradores (2010). Los cebadores oligonucleotídicos usados para clonación de la biblioteca difirieron de los descritos por Schaefer y colaboradores en el sentido de que tenían extremos apropiados para clonación a través de *Bsm*BI en nuestro vector de andamiaje de biblioteca (SEQ ID NO: 15). Los dominios VL y VH se unieron mediante PCR de extensión superpuesta. La banda final de scFv se había sometido a un total de 60 ciclos de amplificación por PCR (30 primera ronda, 30 segundas ronda).

Para la clonación de la biblioteca, se cortaron 900 ng del constructo de expresión con *Bsm*BI, se precipitó usando Sureclean (Bioline) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se ligó usando ADN ligasa T4 con 400 ng de producto scFv tratado en forma similar. Se inactivó la ligasa mediante incubación a 65°C durante 10 minutos y se electroporó la ligación en la cepa *Argentum* de *E. coli* (Alchemy Biosciences). Se recuperaron las células electroporadas en medio SOC y se incubaron durante 1 hora a 37°C antes de combinarlas y luego esparcirlas a través de placas de agar LB de 20 x 150 mm con 75 µg/mL de ampicilina. Se incubaron las placas durante una noche a 30ºC. El tamaño de la biblioteca se estimó en 4 x 10^5 clones independientes. Se encontró que 20 de las 20 colonias contenían un inserto del tamaño esperado.

Ejemplo 14 Cribado de una biblioteca de expresión scFv de ratón encapsulada

Los anticuerpos monocatenarios aislados de bibliotecas de expresión en fagos son a menudo difíciles de expresar en *E. coli*, ya sea con bajos niveles de expresión en el periplasma, o son completamente insolubles en el citoplasma debido a la carencia de formación de enlaces disulfuro entre las láminas B del pliegue de Ig. Para determinar si la expresión encapsulada podría utilizarse para seleccionar un andamiaje de scFv de ratón que fuera soluble en el citoplasma de *E. coli*, fue necesario determinar si la solubilidad de scFv se correlacionaba con el comportamiento de la proteína de fusión.

Se predijo que una scFv soluble útil tendría bajos niveles de agregación y al menos un nivel moderado de expresión. Esto se podría juzgar visualmente como un clon que permitió la unión del dominio KzPG en una célula permeabilizada con la pared celular (y por lo tanto, no localizada en un cuerpo de inclusión dentro de la célula) y que mostró una al menos expresión moderada del dominio informador SNAP.

Para cribar estos parámetros, se escogieron colonias individuales y se indujo la expresión de la proteína de fusión usando arabinosa como se describió previamente en el Ejemplo 1. Después de la permeabilización se marcaron con ligando de SNAP y se observaron usando microscopía de fluorescencia. Se caracterizaron los clones de la biblioteca en cuatro categorías con base en su expresión y distribución celular del SNAP reportero, cuyos ejemplos pueden observarse en la Figura 20.

1) sin expresión de SNAP

2) expresión moderada/alta de SNAP en cuerpos de inclusión agregados (Figura 20, panel izquierdo)

3) expresión débil de SNAP con localización en la pared celular (Figura 20, panel central)

4) expresión alta de SNAP con localización en la pared celular (Figura 20, panel derecho)

Solamente los clones con expresión y solubilidad alta fueron analizados adicionalmente. Sin embargo, como la expresión débil del reportero SNAP puede deberse a expresión ineficiente de una proteína no optimizada para expresión en *E. coli*. se espera que una proporción de estos clones pruebe ser excelente para expresión de bibliotecas citoplasmáticas solubles si se optimiza su uso de codón.

Se secuenciaron clones con alta expresión del reportero SNAP y una distribución uniforme alrededor de la pared celular de células permeabilizadas para confirmar la presencia de un inserto de scFv que estaba en el marco de traducción correcto con el resto de la proteína de fusión. En todos los 21 clones analizados, se encontró que el inserto de scFv era de longitud completa, con la longitud correcta de la región enlazadora de glicina/serina y en el marco de lectura correcto para la traducción de toda la proteína de fusión. Esto sugirió que el método de cribado de acuerdo con una realización de la invención identificaba correctamente los genes de scFv de ratón que se expresaron en una forma soluble en el citoplasma de células de *E. coli.* Para confirmar que las proteínas de scFv aisladas de la biblioteca eran solubles en el citoplasma de *E. coli* fueron transportados desde el constructo de la biblioteca hasta un vector de expresión inducible por arabinosa con un epítopo FLAG del extremo terminal C con una región espaciadora interviniente ya sea de I27-RL6 o RL6.

Después de la inducción de la expresión de la proteína por arabinosa, se extrajeron las proteínas de fusión scFv::I27::RL6: FLAG o scFv::RL6: FLAG solubles con 8TGP al 0,5%. El material celular insoluble se sedimentó y se resuspendió en regulador de carga de SDS-PAGE con β-mercaptoetanol por sonicación de la muestra y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Se cargaron volúmenes iguales de cada fracción en geles de SDS-PAGE al 10% y se sometieron a electroforesis. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que se bloquearon a continuación con leche en polvo desnatada al 5%. Se probó la expresión de proteína recombinante usando una dilución 1: 1000 de un anticuerpo αFLAG de oveja (Sigma) seguido por un anticuerpo secundario conjugado con anti-HRP de ratón. Se uso detección de quimioluminiscencia.

La Figura 21 demuestra que el método de acuerdo con la realización de la invención es capaz de identificar genes de scFv que se expresan en una forma principalmente soluble dentro del citoplasma bacteriano. La transferencia tipo Western de los perfiles de expresión se compara en cada muestra con la microscopía de fluorescencia detectada por el ligando de SNAP para el constructo scFv::I27::RL6::FLAG.

Ejemplo 15. Generación del lisógeno P2 en la cepa *Argentum* de *E. coli*

Se creó un lisógeno P2 de *Argentum* (K12; ΔmcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ΔendAlacZΔM15) por excrecencia a partir de una sola placa de P2 sobre una capa de células de *Argentum*. Se realizó la infección del fagos como lo describen Kahn y colaboradores (1991).

Ejemplo 16. Desactivación de ΔYK de P2

a. Generación por recombinación homóloga

El bacteriófago P2 tiene genes para un sistema putativo de holina y lisina, similar al sistema de lisis caracterizado para muchos bacteriófagos líticos y lisogénicos. La holina proporciona acceso a través de la membrana interna al espacio periplásmico para que la enzima lisina degrade la pared celular de mureina.

El gen K de P2 (SEQ ID NO: 17) y el gen Y (SEQ ID NO: 18) codifican lisozima y holina putativas, respectivamente. Estos genes fueron suprimidos usando recombinación homóloga en forma similar a como lo describen Hamilton y colaboradores (1989). Las regiones de flanqueo de homología se seleccionaron a partir del genoma de P2 (secuencia del GenBank NC_001895.1) y se clonaron entre un casete de selección de kanamicina flanqueado por FRT. La región de reemplazo del genoma de P2 fue de 6.721 a 7.487 pb.

Después del reemplazo de los genes YK objetivo, se eliminó el casete de kanamicina mediante FLP recombinasa expresada a partir del plásmido pCP20, como lo describen Cherepanov y Wackernagel (1995). La cepa resultante tenía una supresión de los genes YK con un péptido corto de 20 mer que permanecía como el único ORF.

La cepa K12 P2 ΔYK se ensayó funcionalmente mediante infección con el bacteriófago P4. Se infectaron cultivos de *Argentum* (P2) y *Argentum* (P2 ΔYK) con 10^3 pfu del bacteriófago P4 y se vertieron en la parte superior de las placas de agar. Se observó que se forman placas en los cultivos de Argentum (P2) pero no de Argentum (P2 ΔYK).

b. Ensayo utilizando P4 vir1 y Ready-Lyse

Para probar la funcionalidad de la supresión de YK del bacteriófago P2 (P2 ΔYK) para replicar y empaquetar un bacteriófago P4 infectante, se infectó la cepa P2 ΔYK con el mutante P4, P4*vir*1, que tiene una mutación que aumenta la transcripción de la región de control de P4 y tiene un fenotipo de placa clara.

Las células de P2 ΔYK se cultivaron hasta fase logarítmica temprana y se suplementaron con $CaCl_2$ 1 mM. Se añadió 1 µL de un sobrenadante lisado que contenía 10^9 pfu/mL del bacteriófago P4 vir1 a 1 mL de cultivo de P2 ΔYK y se incubó durante 80 minutos a 37ºC. Se centrifugó la suspensión para sedimentar las células, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado tres veces en medio LB que contenía EGTA 0,08 mM y $MgCl_2$ 2,5 mM para remover el P4vir1 no unido. Las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB y luego se dividieron en tres muestras. Se mantuvo una muestra sin tratamiento adicional (Muestra 1, no permeabilizada). Las muestras 2 y 3 se trataron adicionalmente por precipitación y resuspensión en LB suplementado con 0,5% del detergente 8TGP para permeabilizar tanto las membranas interna como externa. Las células fueron luego sedimentadas y lavadas dos veces en medio LB no suplementado. Los sedimentos de células lavadas permeabilizadas se resuspendieron en medio LB. La muestra 2 (permeabilizada) se mantuvo sin tratamiento adicional. La muestra 3 (permeabilizada; lisozima) se trató adicionalmente con 0,5 µL de Ready-Lyse (Epicenter, EE.UU.), que es una lisozima recombinante. La rápida disminución de la turbidez indicó que la pared celular de peptidoglicano se degradada por Ready-Lyse y que cualquier partícula P4 vir empaquetada se liberaría en el lisado.

Se añadieron luego 10 µL de cada una de las muestras 1 y 2 y 0,1 µL de la muestra 3 (una dilución del lisado sin purificar) a 200 µL de células K12 frescas (P2) suplementadas con $CaCl_2$ 1 mM. Las células se incubaron a 37ºC durante 20 minutos, luego se añadieron 7 mL de agar de la parte superior (medio LB,% de agar) y se vertieron sobre placas de LB previamente calentadas. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C y se determinó la presencia de placas de P4vir1 en el cultivo de K12 determinado la mañana siguiente.

La muestra 1, que representaba células infectadas con P4 que no habían sido permeabilizadas, produjo 83 colonias en la placa superior de agar. La muestra 2, que representa células infectadas con P4 que habían sido permeabilizadas por detergente, produjo 34 colonias. La muestra 3, que representa células infectadas con P4 que habían sido permeabilizadas por el detergente y luego degradada la pared celular por la lisozima, produjo 168 colonias.

Ajustando la dilución de la muestra, las células P2 ΔYK tratadas con lisozima permeabilizadas (Muestra 3), tenía 200 veces más bacteriófago P4vir1 que la Muestra 1 y 500 veces más bacteriófago P4 vir1 que la Muestra 2.

La presencia del bacteriófago P4vir1 competente para la replicación en células P2 ΔYK K12 infectadas demostró que la supresión de los genes de lisis de YK no evitó la replicación del genoma de P4vir1, o el montaje de partículas funcionales de bacteriófago. Sin embargo, la supresión de los genes de lisis de YK evitó la liberación de las partículas de bacteriófago ensambladas a partir de las células infectadas. La permeabilización de las membranas celulares interna y externa, lograda mediante el tratamiento con detergente, no produjo la liberación de partículas de bacteriófago en solución. Sin embargo, el tratamiento de las células permeabilizadas con una lisozima liberó bacteriófago infeccioso en solución.

Ejemplo 17. Colisógeno P2 ΔYK/P4 con activador inducible

a. Generación de un colisógeno P2/P4 en células C1a

Históricamente, la cepa utilizada para experimentar con el bacteriófago P2 y su satélite, P4, es la cepa C de *E. coli* (Wiman y colaboradores, 1970). Utilizando un derivado de la cepa C, C1a (Sasaki y Bertani, 1965), se estableció un lisógeno P2 mediante subclonación de células lisogénizadas a partir de colonias de P2, como se ha descrito anteriormente. De forma similar, se establecieron colisógenos P4 de la cepa C1a P2.

Una cepa de colisógeno P2/P4 tiene ambos profagos bajo represión transcripcional. Para usar esta cepa para empaquetar de forma inducible un plásmido de una biblioteca de cósmidos, es necesario activar ambos fagos. Para el otro fago templado bien caracterizado, lambda, la liberación de represión se produce con la inactivación de la proteína represora, cI, ya sea mediante escisión mediada por RecA/LexA o utilizando un represor mutante termolábil, cI857. Sin embargo, P2 se conoce como un fago no inducible en el sentido de que no es sensible a la depresión por inactivación de su represor, presumiblemente debido a que es incapaz de coordinar la escisión del genoma con transcripción génica estructural de replicación (Bertani, 1968). Sin embargo, el fago satélite P4 infectante tiene mecanismos de activación del profago P2 reprimido tras la entrada. La proteína P4ε (épsilon) actúa como un antirrepresor a través de la unión con la proteína represora P2. Además, la proteína P4 δ (delta) es un potente activador de operones estructurales P2, siendo una duplicación fusionada en tándem del activador de transcripción P2 ogr. Sin embargo, un profago P4 tiene un control complejo y estricto tanto de su propia activación como de la activación de P2.

El profago P4 usa la interacción entre un represor transcripcional, la proteína Vis, en su propio promotor y los genes *Eta* y *cI* secuencia abajo que se basan en el acoplamiento de transcripción y traducción para producir un complejo inhibidor con base en el ARN de *cI*. En última instancia, este complejo actúa para bloquear la expresión de la proteína P4ε, que es un antagonista de unión de la proteína represora P2.

La desrepresión de los profagos P4 y P2 requiere la inhibición del represor P2 por la proteína P4ε. El P2 activado a su vez produce los activadores de la transcripción de Cox y Ogr que actúan in en trans para promover la transcripción del gen P4 δ, que activa adicionalmente P4 a través del promotor Vis y actúa también en trans sobre los operones del gen estructural P2.

En un sistema tan complejo, con muchos elementos que interaccionan para reforzar sus efectos combinados, una célula que contiene ambos profagos reprimidos, P2 y P4, debe controlar estrechamente la expresión de todos los genes activadores para evitar que se produzca un efecto de retroalimentación positiva. Los activadores potenciales de los profagos incluyen los activadores de transcripción P2*cox*, P2*ogr* y P4 δ, así como el antirrepresor P4ε.

Los tres activadores de transcripción se clonaron bajo el control transcripcional estrecho proporcionado por el alelo sensible a la temperatura del represor del fago λ, cI857. El origen de replicación del plásmido pACYC184 de bajo número de copias compatible con el origen pUC permite el mantenimiento del activador inducible junto con un plásmido de biblioteca con base en pUC.

Se transformó el colisógeno C1a P2/P4 con los constructos de expresión inducibles y se cultivó a 30ºC. Los cultivos se hicieron crecer hasta la fase logarítmica temprana antes de la inducción mediante cambio de temperatura a 42°C durante 20 minutos, antes del crecimiento a 37°C hasta que se produjo la lisis.

Los tres activadores fueron capaces de inducir lisis en un colisógeno, aunque el gen P4 δ demostró lisis más temprana, seguida por el *ogr* y luego *cox*. La secuencia de polinucleótidos de P4 δ inducible por temperatura se proporciona en la SEQ ID NO: 19.

La producción de partículas del bacteriófago P4 infeccioso se confirmó mediante titulación del lisado contra a cultivos de lisógeno C1a P2. Se determinó que el título de P4 era > 10^9 pfu/mL.

Ejemplo 18. P2 ΔYK con transmisión de cósmidos

Para utilizar el sistema P2/P4 para el cribado y transmisión de la biblioteca génica, se construyó un vector que contenía la región P4 *cos*. Se amplificó una región de 389 pb a partir de P4 que parte del gen *psu* que se extiende sobre el sitio de escisión de *cos*, y hasta el gen *gop* (11461 pb hasta 225 pb del genoma de P4; número de acceso del NCBI NC_001609) por PCR y se clonó en un vector plásmido de origen pUC de alto número de copias. Se verificó la identidad de la región P4 *cos* por secuenciación. El vector también contenía al gen *arac* y al promotor inducible por arabinosa que controla la expresión del sistema de cribado intracelular de una biblioteca como se describe en la solicitud de patente No. PCT/AU2010/001702.

Al igual que con todos los vectores cósmidos, ya sea para bacteriófagos P2, P4 o λ, existe un tamaño mínimo para el empaquetamiento en la cabeza de la cápside para producir una unidad transmisiva viable. Para P4, esto se ha determinado que es de aproximadamente 9,2 kb (Kim y Song, 2006). Para lograr este tamaño mínimo para empaquetamiento en una cabeza de cápside P4, se aumentó el tamaño total del vector cosmído se aumentó hasta 10,7 kb, más cerca del tamaño del genoma P4 de tipo silvestre de 11,6 kb, por clonación en un fragmento de 'relleno' de 4,3 kb de ADN genómico de *E. coli*.

Para demostrar el empaquetamiento conjunto del vector cosmído residente en un colisógeno C1a P2 ΔYK/P4, se transformó la cepa con el vector cósmido resistente a ampicilina con cadena principal de pUC así como el vector resistente a cloranfenicol con cadena principal de pACYC184, con el gen P4 δ inducible por temperatura.

La cepa con ambos colisógenos y ambos plásmidos se cultivó a 30ºC hasta fase logarítmica temprana antes inducir proteína P4 δ por cambio de temperatura a 42ºC durante 20 minutos, seguido de crecimiento a 37ºC durante 1 hora. Como control, se indujo también una cepa que contenía un plásmido de biblioteca sin la región P4 *cos* y el fragmento de relleno para empaquetamiento de la cápside P4.

Para liberar los cósmidos empaquetados y el bacteriófago P4, se sedimentaron y resuspendieron las células inducidas en medio de permeabilización (medio LB + 8TGP al 0,5%) durante 10 minutos a temperatura ambiente (~ 25ºC). Después de la permeabilización, se sedimentaron y resuspendieron en LB y se añadió 0,5 µL de lisozima Ready-Lyse para digerir la pared celular. La lisis se confirmó por la disminución de la turbidez. También se confirmó que el cloroformo era también eficaz en la permeabilización de la célula para la acción de Ready-Lyse en la pared celular. Los cósmidos empaquetados y el bacteriófago P4 se titularon por infección de lisógenos C1a y C1a P2, respectivamente.

Se confirmó que el cósmido de la biblioteca se empaquetó en cantidades aproximadamente iguales que el profago P4 residente en células P2 δ YK inducidas, ya que se obtuvieron aproximadamente el mismo número de colonias resistentes a los antibióticos de la recuperación del cósmido comparado con las colonias de P4. No se obtuvieron colonias de la infección con un lisado preparado a partir de la cepa que portaba el plásmido de la biblioteca que carecía de una región de P4 *cos* y un fragmento de relleno.

También se observó que, a diferencia de la pobre estabilidad del bacteriófago P4 o de los cósmidos empaquetados en lisados no purificados de células C1a P2 lisadas (almacenadas a 4ºC en medio LB con Mg/EGTA), presumiblemente debido a la acción de proteasas celulares también en el lisado, el bacteriófago P4 y los cósmidos empaquetados liberados de las células P2 δ YK que fueron primero permeabilizadas y lavadas, antes de ser lisadas por la acción de la lisozima añadida en forma exógena (Ready-Lyse), eran estables a temperatura ambiente, con solamente una caída menor en el título después de dos días. Esto es presumiblemente debido a la liberación de las proteasas antes mencionadas de las células permeabilizadas que son retiradas por lavado de las partículas infecciosas que son retenidas por la pared celular durante las etapas de precipitación y cambio de medios. Por lo tanto, se pueden producir fácilmente un alto título de partículas de cósmidos por inducción de temperatura, permeabilización y cambio de medio, y manteniendo un título estable sin requerir etapas de purificación por ultracentrifugación prolongada según protocolos estándar de bacteriófagos.

Ejemplo 19 Permeabilización de *E. coli* usando disolventes orgánicos

Además de la permeabilización de células Gram negativas usando detergentes, otros agentes químicos para interrumpir la integridad de la membrana podrían ser los disolventes orgánicos lipófilos. Los disolventes orgánicos han sido utilizados sustancialmente en la técnica anterior en la permeabilización y fijación celular para inmunomarcación por microscopía (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En el método de acuerdo con una realización de la invención, la membrana celular se permeabiliza para la entrada de grandes complejos de inmunoglobulina que se unen a objetivos intracelulares.

En particular, el disolvente orgánico cloroformo también se ha usado para matar selectivamente células bacterianas en una suspensión de células/bacteriófagos, presumiblemente a través de la permeabilización de las membranas celulares (Sambrook y colaboradores, 2001). El cloroformo también se ha usado en genética de bacteriófagos líticos para permitir el rescate de mutantes de holina que fueron incapaces de permeabilizar la membrana interna para liberar lisozima del citoplasma celular para liberación de bacteriófagos (Ziermann y colaboradores, 1994). De forma similar, se usó para rescatar mutantes de lisozima que eran incapaces de hidrolizar la pared celular de peptidoglicano mediante permeabilización de la membrana externa para permitir la entrada activa de la lisozima exógena al periplasma (Ziermann y colaboradores, 1994). Por lo tanto, el cloroformo fue capaz en forma demostrable de permitir al menos el paso de lisozimas pequeños (~ 15 kD) a través de las membranas tanto interna como externa de la célula de *E. coli* Gram-negativa.

Para ensayar disolventes orgánicos para la permeabilización de las membranas celulares para su uso en expresión intracelular descrita por el método de acuerdo con una realización de la invención, se suspendieron células de *E. coli* que expresan la proteína de fusión αGFP::RL6::KzPG::SNAP::DBP (expresión inducida como se describe para el Ejemplo 8) en mezclas acuosas de disolventes orgánicos. La permeabilización de la membrana se indicó mediante la unión de un ligando fluorescente de unión al ADN de pequeño peso molecular, Gel Red, y de una proteína de 30 kD, eGFP.

Aunque algunos disolventes orgánicos permanecen miscibles en agua (por ejemplo, los alcoholes de cadena más corta), otros son en gran medida inmiscibles y la mezcla se divide en fases acuosa y no acuosa (por ejemplo, cloroformo

y butanol). La división de la fase representa la saturación de la baja solubilidad del disolvente orgánico en la fase acuosa.

Las células que expresan la proteína de fusión αGFP::RL6::KzPG::SNAP::DBP se recogieron por centrifugación y se permeabilizaron con una de las siguientes composiciones de disolvente durante 10 minutos a 25ºC. Se utilizó medio de crecimiento LB para el componente acuoso de la mezcla. También se realizaron controles regulados con Tris.

10% de Etanol; 20% de etanol; 30% de Etanol

10% de Metanol; 20% de metanol; 30% de Metanol

10% de isopropanol; 20% de isopropanol; 30% de isopropanol

10% de DMSO; 20% de DMSO; 30% de DMSO

10% de Acetona; 10% de Acetona; 30% de Acetona

Butanol (1: 5)

Cloroformo (1: 5)

Tris 50 mM/LB (pH 7,0); Tris 1 M/LB (pH 7,0)

Después del tratamiento con disolventes, se sedimentaron las células mediante centrifugación, se lavaron una vez con medio LB por suspensión, se sedimentaron por centrifugación y luego se suspendieron en medio LB que contenía tanto al fluoróforo de unión al ADN de pequeño peso molecular, Gel Red (dilución 1: 10.000 en agua), como eGFP. Después de 20 minutos de incubación a 25°C en medio para marcación, se sedimentaron las células por centrifugación, se lavaron en LB mediante resuspensión, luego se observaron por microscopía de fluorescencia. La Figura 22 demuestra que, de los disolventes orgánicos analizados, el cloroformo y el butanol permeabilizaron el *E. coli* para permitir que un ligando de peso molecular pequeño entre en el citoplasma (A), pero sólo el cloroformo permitió la entrada de una proteína de gran peso molecular (~ 30 kD).

Ejemplo 20. Expresión en la cápside usando la proteína de decoración gpL de P2

Se detectó la proteína gpL del bacteriófago P2 como un componente estructural de viriones maduros por espectrometría de masas (Chang y colaboradores, 2008) y se presume que es el equivalente funcional de la proteína de la cápside gpD del bacteriófago lambda, aunque las dos proteínas no demuestran ninguna región de homología significativa mediante una alineación por parejas mediante BLAST (NCBI). La proteína gpD de lambda tiene una longitud de 110 residuos, mientras que la proteína gpL de P2 tiene una longitud de 169 residuos.

Para evaluar si la proteína gpL de P2 funcionaría para la expresión en la cápside, se fusionó la secuencia de αGFP: I27 con los extremos de los terminales N y C de gpL de P2 para crear las proteínas de fusión enumeradas como las SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO : 21. La proteína de fusión también incluía una etiqueta de epítopo FLAG que intercalaba los dominios gpL y αGFP: I27. La expresión de la proteína de fusión se hizo inducible por arabinosa mediante clonación de la secuencia génica secuencia abajo del el promotor de *araBAD*, con un regulador transcripcional araC secuencia arriba. La secuencia de ADN del vector de expresión αGFP: I27: gpL se enlista en la SEQ ID NO: 22.

El plásmido que codifica la proteína de fusión αGFP: I27: gpL se transformó en un huésped K123 de *E. coli* que contiene un profago Hy5. El fago Hy5 es un híbrido de los fagos relacionados P2 y 186 que contienen los genes estructurales de P2 bajo control transcripcional de 186 (Bradley y colaboradores, 1975; Younghusband y colaboradores, 1975). Además, el represor *cI* de Hy5 (186) es sensible a la temperatura, permitiendo la inducción por temperatura del crecimiento del fago.

La expresión de la proteína de fusión αGFP: I27: gpL mediante arabinosa y análisis por SDS-PAGE produjo una banda superior de aproximadamente 55 kD, que era mayor que el tamaño esperado de 44 kD que estaba tanto en las fracciones solubles como insolubles, y una banda inferior que estaba únicamente en la fracción soluble (Figura 23).

Para demostrar que la proteína de fusión αGFP: I27: gpL estaba unida a la cápside del fago y era funcional para unión mediante expresión en el fago, se calentó la cepa del profago con el constructo de expresión a 45ºC durante 15 minutos para activar la replicación de Hy5. Después del choque térmico las muestras se desplazaron hacia abajo en temperatura para crecimiento a 32ºC. Se indujo la expresión de la proteína de fusión 30 minutos después de la disminución de la temperatura con la adición de arabinosa a una concentración de 0,2%. Se incubaron los cultivos durante un tiempo total de 70 minutos a 32°C para máxima liberación de fagos.

Para captura del fago Hy5 que expresa la proteína de fusión αGFP: I27: gpL, se marcaron primero las perlas Dynal recubiertas con estreptavidina (M-270, catálogo No. 653-05, Life Technologies) con His6-GFP biotinilado y se lavaron completamente con TBS. La marcación de las perlas Dynal con eGFP se confirmó mediante microscopía de fluorescencia.

La Tabla 2 enumera los resultados de la expresión de la proteína de fusión gpL en la captura de fagos Hy5 por las perlas Dynal. Estos datos demuestran que la fusión del anticuerpo αGFP con la proteína de la cápside gpL de P2 da lugar a un enriquecimiento de 82 veces por las perlas de Dynal sobre el fagos que se empaquetan usando la proteína gpL de tipo silvestre. Además, incluso la muestra no inducida con un nivel no detectable de expresión de la proteína de fusión (figura 23, muestra 1) fue aún purificada por afinidad con un nivel significativo por encima del control, lo que sugiere que incluso un nivel muy bajo de expresión resultó en una captura de fago.

Tabla 2. Enriquecimiento del fago Hy5 que expresa la proteína de fusión de la cápside gpL sobre el control Hy5

	Título del patrón (PFU/mL)	Rendimiento de exploración (PFU)	Enriquecimiento (número de veces sobre Hy5)
Hy5	3.5×10^9	93	(muestra de referencia)
Hy5 + 〈 GFP:I27:gpL (no inducida)	1.2×10^9	202	6.5 3
Hy5 + 〈GFP:I27:gpL (inducida)	1.1×10^9	2,550	82 3

Ejemplo 21. Supresión de los genes de lisis SR de fase lambda

Los genes de lisis de fase lambda se localizan en el brazo derecho del genoma en una agrupación que contiene los genes S'/S (holina (SEQ ID NO: 23) anti-holina), R (endolisina (SEQ ID NO: 24)), Rz/Rz1 (requeridos para lisis en ciertos medios). La agrupación de lisis está dentro de una gran unidad transcripcional más grande transcrita desde el promotor pR que es responsable de la transcripción de todos los genes estructurales y líticos de lambda. El ARNm de pR' es un solo transcrito que cubre por lo tanto aproximadamente la mitad del genoma lambda. Para inactivar los genes de lisis se decidió suprimir los genes usando recombinación homóloga. Para permitir la selección fácil de los mutantes lambda los genes de lisis fueron reemplazados por un gen de resistencia a la kanamicina (KanR). Sin embargo, para asegurar que no se insertaran secuencias promotoras o terminadoras de transcripción que tuvieran como resultado una expresión génica estructural del profago que pudiera ser perjudicial para la viabilidad celular, también se suprimió el gen vecino *bor* no esencial. El gen *bor*, que confiere resistencia al suero a la célula huésped de E. coli, es expresado constitutivamente en el profago en dirección opuesta a la pR' bajo su propio promotor (Barondess y Beckwith, 1995). Utilizando fragmentos gBlocks sintéticos (IDT), se diseñó un truncamiento de la agrupación de lisis con una fusión del codón de inicio del gen KanR con el codón de inicio del gen *bor*. La única secuencia que permanece de la agrupación de lisis lambda de esta supresión fue un péptido truncado de secuencia MKMPEKQLEGTQKYINEQCR (SEQ ID NO: 25). La secuencia de ADN del constructo de supresión de lisis con brazos sintéticos y casete KanR se enlista como la SEQ ID NO: 27.

Los brazos de homología sintética y el casete KanR se clonaron en el vector de clonación de PCR con base en pUC, pAcquire (Alchemy Biosciences, Melbourne, Australia), y se verificaron mediante secuenciación.

Para llevar a cabo la supresión de la agrupación de lisis lambda, se transformó el constructo en un lisógeno cI857sam7 lambda de la cepa de *E. coli* ED8739 (F-, *metB, hsdS, supE, supF*) y se indujo la lisis del fago por inducción de temperatura (42ºC, 10 min) seguido por el cultivo a 37ºC durante 1 hora. Se clarificó por centrifugación 1 mL del sobrenadante que contenía el fago y se añadió 1 gota de cloroformo. Se infectó luego un cultivo de ED8739 con suplemento de magnesio (10 mM) y maltosa (0,1%) con diluciones del lisado del fago y se recuperaron los lisógenos por excrecencia a 30ºC durante 2 horas antes de la siembra en placa de agar con LB + kanamicina (15 µg/mL) que se cultivaron durante 16 horas a 30°C. Como el plásmido objetivo fue lo suficientemente pequeño para los recombinantes lambda::, que se empaquetan como fago viable, se cribaron por lo tanto las colonias de profago resistentes a la kanamicina por la pérdida del gen de resistencia a la ampicilina (es decir, Kan^R/Amp^S) que indicaría un evento de recombinación homóloga entre ambos brazos de homología del constructo objetivo, cortando la agrupación de lisis y reemplazándola con el casete de kanamicina según se desee. Se identifico el profago Kan^R/Amp^S y para confirmar que se efectuó la supresión sin mutaciones no deseadas, se amplificó la región mediante PCR y se secuenció. Se encontró que todos los clones eran correctos según lo diseñado.

Ejemplo 22. Empaquetamiento del genoma del ΔSR lambda

Para demostrar que la supresión de la agrupación de lisis aún producía el mismo número de fagos empaquetados viables por célula (es decir, que el transcrito pR 'modificado no afecto la producción de las proteínas estructurales del fago), se cultivó el profago *cI857sam7ΔSR* lambda junto con el profago *cI857sam7* lambda a 30ºC hasta una densidad celular idéntica y se indujo la producción del fago mediante inducción por temperatura (42ºC, 10 minutos) seguido de crecimiento a 37ºC durante 1 hora. Como se esperaba, el cultivo de cI857sam7 lambda lisado hasta completarse, mientras que el *cI857sam7ΔSR* lambda falló en la lisis. Se recolectó el cultivo de *cI857sam7ΔSR* lambda mediante centrifugación y se resuspendió en LB + 8TGP al 0,5% y se incubó a 25°C durante 10 minutos. Se recolectaron luego las células permeabilizadas por centrifugación, se lavaron una vez con LB + $MgSO_4$ 10 mM y se resuspendieron en el volumen original de 1 mL de LB + $MgSO_4$ 10 mM y se lisaron usando 0,5 µL de Ready-Lyse (Epicenter). Se añadió una gotita de cloroformo a cada lisado para matar cualquiera de las células viables restantes y se tituló el fago usando diluciones en serie infectadas en cultivos de ED8739 y se sembraron en placa sobre agar superior de LB suplementado con $MgSO_4$ 10 mM y maltosa al 0,1%. Las placas se cultivaron durante 16 horas a 37°C antes de contar las colonias. Tanto, el profago *cI857sam7* lambda como el profago *cI857sam7ΔSR* lambda produjeron títulos de fago de ~ 1 x 10^9 pfu/mL lo que demuestra que la supresión de la agrupación de lisis *ΔSR* lambda, y la correspondiente inserción de un gen de kanamicina en la dirección transcripcional opuesta, no perturbaron la transcripción o la traducción de los genes estructurales.

Ejemplo 23. Expresión en la cápside del fago *ΔSR* lambda

La expresión en la cápside usando el gen gpD lambda ha sido bien documentada en la literatura, al igual que los métodos de exploración de fagos para la unión de objetivos usando la expresión de gpD. Sin embargo, la combinación del uso de la expresión en cápside con fago de lisis defectuosa no ha sido propuesta antes de esta solicitud. Además, la combinación de la expresión en cápside con el fago de lisis defectuosa en células permeabilizadas de acuerdo con una realización del método de la invención permite el cribado para unión objetivo a la cápside del fago mediante detección por FACS, que es un método de alto rendimiento de caracterización clonal.

Para demostrar la unión del objetivo con el fago de lisis defectuosa retenido dentro de las células permeabilizadas, se fusionó una secuencia que codifica un anticuerpo monocatenario (scFv) que se une a una proteína fluorescente relacionada con GFP, mAG1 (Karasawa y colaboradores, 2003), con el extremo 3' del gen gpD lambda. El scFv de α-mAG1 es una clase rara de anticuerpo que es soluble y estable cuando se expresa en el citoplasma bacteriano en un estado reducido. Se fusionó un epítopo FLAG al extremo terminal C de la proteína de fusión gpD::α-mAG1 y se demostró que la proteína soluble de longitud completa se expresaba en el citoplasma de células de *E. coli* utilizando un anticuerpo monoclonal αFLAG.

Se construyó un cósmido lambda que expresa la proteína de fusión gpD::α-mAG1 a partir del promotor araBAD, bajo represión por la proteína araC e inducible por arabinosa. El cósmido también contenía características comunes con otros vectores cósmidos comercialmente disponibles, y en forma privada, de la región *cos* lambda (SEQ ID NO: 26), del origen de replicación del plásmido bacteriano y genes de resistencia a antibióticos (AmpR y ChlR). También contenía un fragmento de relleno para permitir el empaquetamiento del fago *in vivo*. Un ejemplo de vectores cósmidos comercialmente disponible es pFOS1 (New England BioLabs (NEB)).

Se transformó el cósmido gpD::α-mAG1 en una cepa de *E. coli* ED8739 que contenía al profago *cI857ΔSR* lambda y se cultivó a 30°C para crecimiento vegetativo. Para inducir las funciones del fago, se cultivó la cepa en medio LB a una densidad baja, luego se calentó a 42ºC durante 15 minutos, antes del cultivo a 31ºC durante 75 minutos. La inducción de la proteína de fusión gpD::α-mAG1 se inició inmediatamente después de la incubación a 42ºC mediante la adición de arabinosa al 0,2% p/v. Al completarse el crecimiento y empaquetamiento del fago, se permeabilizaron las células mediante el método según una realización de la invención mediante centrifugación y resuspensión en 0,3 volúmenes de LB + 8TGP al 0,5% durante 10 minutos a 25ºC. Luego se centrifugaron nuevamente las células y se lavaron en 1 x volumen de TBS + $MgSO_4$ 10 mM (TBS/Mg), antes de ser sedimentadas y suspendidas en TBS/Mg con exceso de proteína mAG1 durante 20 minutos. Después de la unión de mAG1, se limpiaron las células mediante el lavado de mAG1 no unido con TBS/Mg antes de ser suspendidas para su visualización por microscopía o para análisis por FACS.

La Figura 24 demuestra que la expresión lambda polivalente, cuando se encapsula en células permeabilizadas y se prueba con objetivo fluorescente, genera una señal suficientemente fuerte para la detección visual mediante microscopía de fluorescencia. Cada célula bacteriana demostró una marcación puntual entre 10 y 30 focos. Estos focos sólo se observaron en células que expresan la proteína de fusión gpD::α-mAG1 y se indujeron para el fago. Los focos no se observaron dentro de las células que no expresaban la proteína de fusión, o no se indujeron para el fago cuando se probaron con la proteína mAG1. De forma similar, el fago marcado con gpD::α-mAG1 no se unió a la proteína fluorescente relacionada, GFP. Dado que el tamaño ráfaga del fago lambda de tipo silvestre es de 100 a 200 copias por célula y suponiendo que los fagos están concentrados solo dentro de unas pocas regiones de la célula, entonces cada uno de los focos puede contener entre 3 y 20 fagos. Esta estimación puede ser conservadora ya que el tamaño de ráfaga del fago de lisis defectuosa puede ser mayor dado que se permite que la replicación persista más allá del tiempo normal de lisis. Por lo tanto, la expresión polivalente del fago encapsulado de lisis defectuosa, como se describe por el

método de acuerdo con una realización de la invención, permite la detección directa de la unión a proteínas marcadas con fluoróforo por microscopía óptica.

Dado que la sensibilidad de la instrumentación FACS es superior a la obtención de imágenes por microscopía convencional, entonces se esperaba que la detección y recolección de las células que contenían el fago marcado, de aquellas que no estaban marcadas, sería fácilmente realizada dada la intensidad de la señal ya observada por microscopía óptica. La Figura 25 muestra el gráfico de fluorescencia para 100 K eventos en un FACS de afluencia (BD Biosciences) con una entrada de ~1% de células positivas para α-mAG1. La población de células ha sido teñida conjuntamente con el colorante de unión a ADN, Gel Red y la proteína mAG1 fluorescente. La población cerrada de P2 es positiva para α-mAG1- y la población cerrada de P3 es negativa para α-mAG1.

Se recuperó la salida posterior a FACS mediante la adición de la enzima Ready-Lyse seguida por infección en células ED8739 *cI857ΔSR* lambda. Se registró una recuperación de aproximadamente 10 partículas de fago por evento positivo.

Por lo tanto, el cribado por FACS de alto rendimiento del fago encapsulado de expresión en cápside se hace posible usando el método de acuerdo con una realización de la invención.

REFERENCIAS

Aharoni y colaboradores (2005) Chem Biol, 12: 1281-1289

Barondess and Beckwith (1995) J Bact, 177: 1247-1253

Becker y colaboradores (2004) Curr Opin Biot, 15: 323-329

Bertani (1968) Virology, 36: 87-103

Bradley y colaboradores (1975) Mol Gen Genet, 140: 123-135

Briani y colaboradores (2001) Plasmid, 45: 1-17

Briers y colaboradores (2009) Biochem Biophys Res Comm, 383: 187-191

Chang y colaboradores (2008) Virology, 370: 352-361

Chen and Gotschlich (2001) J Bact, 183: 3160-3168

Cherepanov and Wackernagel (1995) Gene, 158: 9-14

Dai y colaboradores (2008) Prot Eng Design Sel, 23: 413-424

Daugherty y colaboradores (2000) J Immunol Methods, 243: 211-227

Farinas (2006) Comb Chem High Thro Screen, 9: 321-328

George, y colaboradores (2003) Protein Engineering, 15: 871-879

Gupta y colaboradores (2003) J Mol Biol, 334: 241-254

Hamilton y colaboradores (1989) J Bact, 171: 4617-4622

Kahn y colaboradores (1991) Meth Enzy, 204: 264-280

Karasawa y colaboradores (2003) J Biol Chem, 36: 34167-34171

Kenrick y colaboradores (2007) Curr Prot Cyt, 4.6.1-4.6.27

Kim and Song (2006) J Micro, 44: 530-536

King y colaboradores (1982) Mol Gen Genet, 186: 548-557

Levy y colaboradores (2007) J Imm Meth, 321: 164-173

Lindqvist y colaboradores (1993) Microbiol Rev, 57: 683-702

Lindqvist and Naderi (1995) FEMS Micro Rev, 17: 33-39

Liu y colaboradores (1997) J Virol, 71: 4502-4508

Lutz and Patrick (2004) Curr Opin Biot, 15: 291-297

Magnet y colaboradores (2007) J Bact, 189: 3927-3931

Maruyama y colaboradores (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91: 8273-8277

Mikawa y colaboradores (1996) J Mol Bio, 262: 21-30

Miller y colaboradores (2006) Nat Meth, 3: 561-570

Montigiani y colaboradores (1996) J Mol Biol, 258: 6-13

Parsons y colaboradores (2006) Biochem, 45: 2122-2128

Rao y colaboradores (2007) J Mol Biol, 370: 1006-1019

Santini y colaboradores (1998) J Mol Biol. 282: 125-135

Sasaki and Bertani (1965) J Gen Micro, 40: 365-376

Sauer y colaboradores (1982) Vir, 116: 523 - 534

Schaefer y colaboradores (2010) Antibody Eng, 1: 21-44

Smith (1985) Science, 228: 1315-1317

Sternberg and Hoess (1995) Poc Natl Acad Sci USA, 92: 1609-1613

Vaccaro y colaboradores (2006) J Imm Meth, 310: 149-158

Wiman y colaboradores (1970) Mol Gen Genetics, 107: 1-31

Woods and Egan (1974) J Vir, 14: 1349-1356

Yankovsky y colaboradores (1989) Gene, 81: 203-210

Younghusband y colaboradores (1975) Mol Gen Genetics, 140: 101-110

Zierman y colaboradores (1994) J Bacteriol, 176: 4974-4984

Reivindicaciones

1. Un método de cribado de un polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo, comprendiendo el método:

a) cultivar una célula bacteriana Gram negativa que comprende un polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de manera que el polipéptido se produzca en la célula,

b) permitir que un fago de lisis defectuosa empaquete el polinucleótido que codifica el polipéptido, en el que el fago de lisis defectuosa se retiene dentro de la célula bacteriana,

c) permeabilización:

i) de la membrana externa de la célula bacteriana, o

ii) de las membranas interna y externa de la célula bacteriana,

d) poner en contacto la célula bacteriana con la molécula objetivo, y

e) cribar el polipéptido para la actividad deseada,

en donde se retiene el polipéptido dentro de la célula bacteriana por la pared celular bacteriana o membrana interna y/o el polipéptido se une a la pared de la célula bacteriana o a la membrana interna.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido está asociado con al menos un segundo polipéptido para formar un complejo proteico que se retiene dentro de la célula bacteriana permeabilizada y/o está unido a la pared celular bacteriana.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde las membranas bacterianas interna y externa se permeabilizan con uno o más detergentes o un disolvente orgánico.

4. El método de la reivindicación 1, en donde:

i) la membrana bacteriana externa está permeabilizada;

ii) la pared celular bacteriana está al menos parcialmente hidrolizada; y

iii) el polipéptido está unido a la membrana interna.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polinucleótido que codifica el polipéptido es un ADN de plásmido, cósmido, fagémido o fago.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el fago de lisis defectuosa es un fago templado seleccionado entre el fago lambda, 186, P2, un híbrido de 186 y P2, y P4 y/o donde el fago de lisis defectuosa es un profago.

7. El método de la reivindicación 6, en donde permitir que el fago de lisis defectuosa empaquete al polinucleótido comprende inducir la activación del profago en la célula bacteriana para producir un fago, en donde el fago empaqueta al polinucleótido y/o en donde inducir la activación del profago comprende producir una o más proteínas activadoras de fagos en la célula bacteriana.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la inducción de la activación del profago comprende inactivar una o más proteínas represoras de fagos en la célula bacteriana.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el fago es de lisis defectuosa debido a la supresión o mutación a una forma inactiva del gen de la lisozima, o supresión o mutación a una forma inactiva de los genes de holina y lisozima.

10. El método de la reivindicación 8, en donde la célula bacteriana comprende al profago lambda y la inducción de la activación del profago comprende la inactivación de un alelo represor sensible a la temperatura de la proteína cI en la célula bacteriana.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método comprende además un cribado adicional del polipéptido para una actividad deseada contra una molécula objetivo en una célula bacteriana Gram negativa, en donde

i) el polinucleótido que codifica al polipéptido no está empaqueta en un fago de lisis defectuosa, y/o

ii) el polipéptido no es retenido dentro de la célula bacteriana por la pared celular bacteriana y/o unido a la pared celular bacteriana.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el cribado adicional se realiza usando un fago lítico o templado para empaquetar al polinucleótido que codifica al polipéptido.

13. El método de la reivindicación 12, en donde la célula bacteriana en el cribado adicional se lisa para liberar al fago.

14. El método de la reivindicación 13, en donde

i) el fago lítico comprende una primera pareja de unión en la capa del fago, y

ii) el polipéptido que se criba para una actividad deseada es una proteína de fusión que comprende una segunda pareja de unión,

en donde la proteína de fusión que comprende la segunda pareja de unión se une a la primera pareja de unión en la capa del fago lítico.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la primera pareja de unión es calmodulina y la segundo pareja de unión es un péptido de unión a calmodulina.

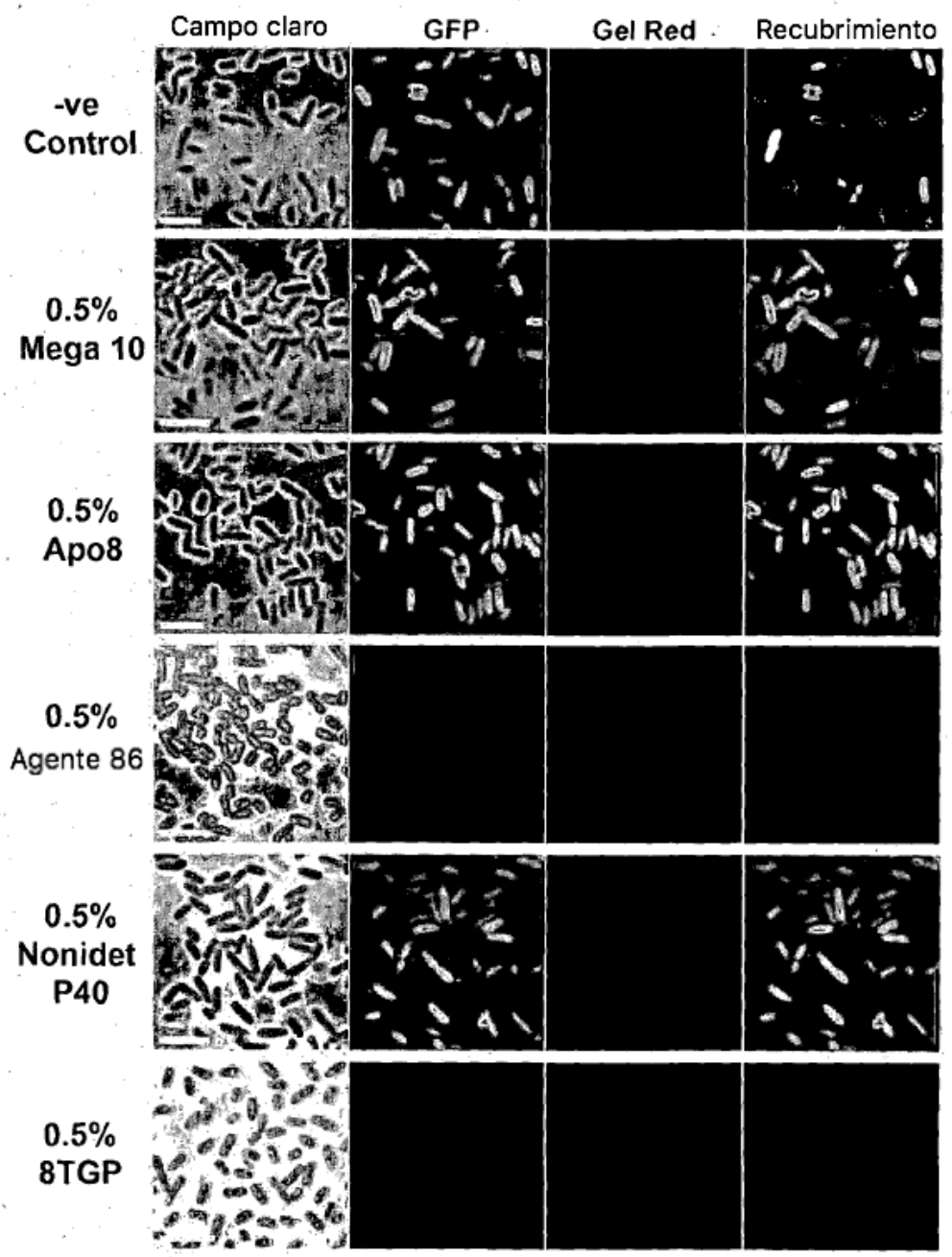
Campo claro
GFP
Gel Red
Recubrimiento
-ve Control
0.5% Mega 10
0.5% Apo8
0.5% Agente 86
0.5% Nonidet P40
0.5% 8TGP

Figura 1

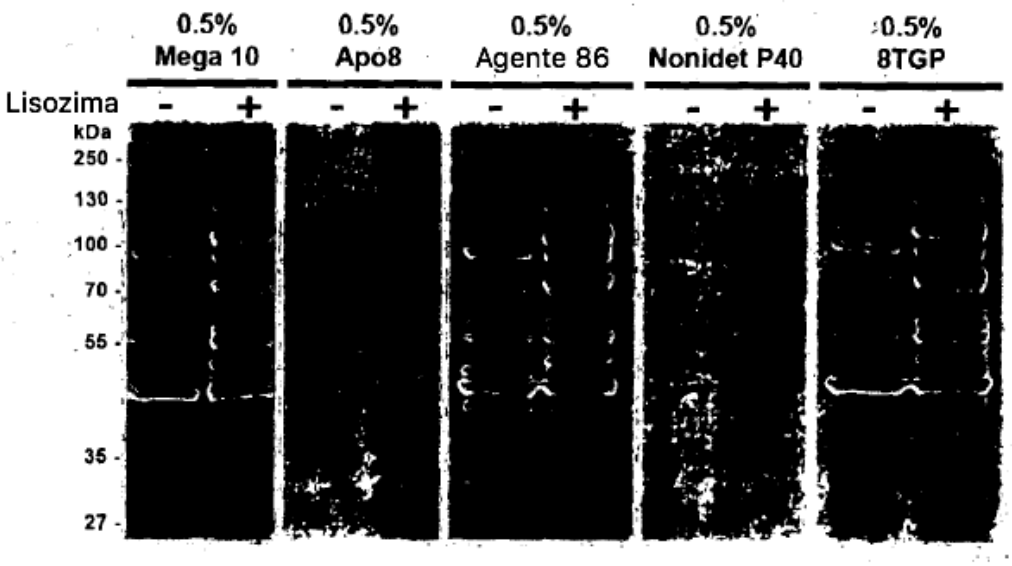
0.5%
Mega 10
0.5%
Apo8
0.5%
Agente 86
0.5%
Nonidet P40
0.5%
8TGP
Lisozima
- +
- +
- +
- +
- +
kDa
250
130
100
70
55
35
27

Figura 2

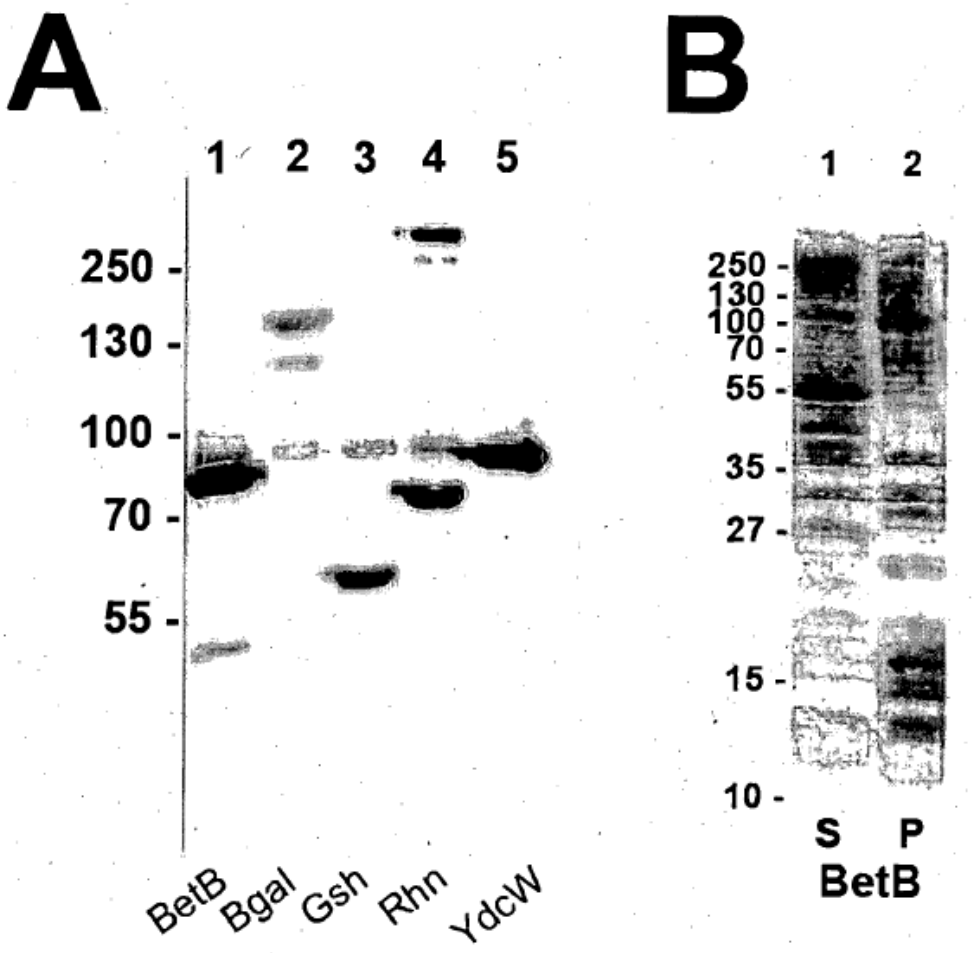
A
1
2
3
4
5
250 -
130 -
100 -
70 -
55 -
BetB
Bgal
Gsh
Rhn
YdcW
B
1
2
250 -
130 -
100 -
70 -
55 -
35 -
27 -
15 -
10 -
S
P
BetB

Figura 3

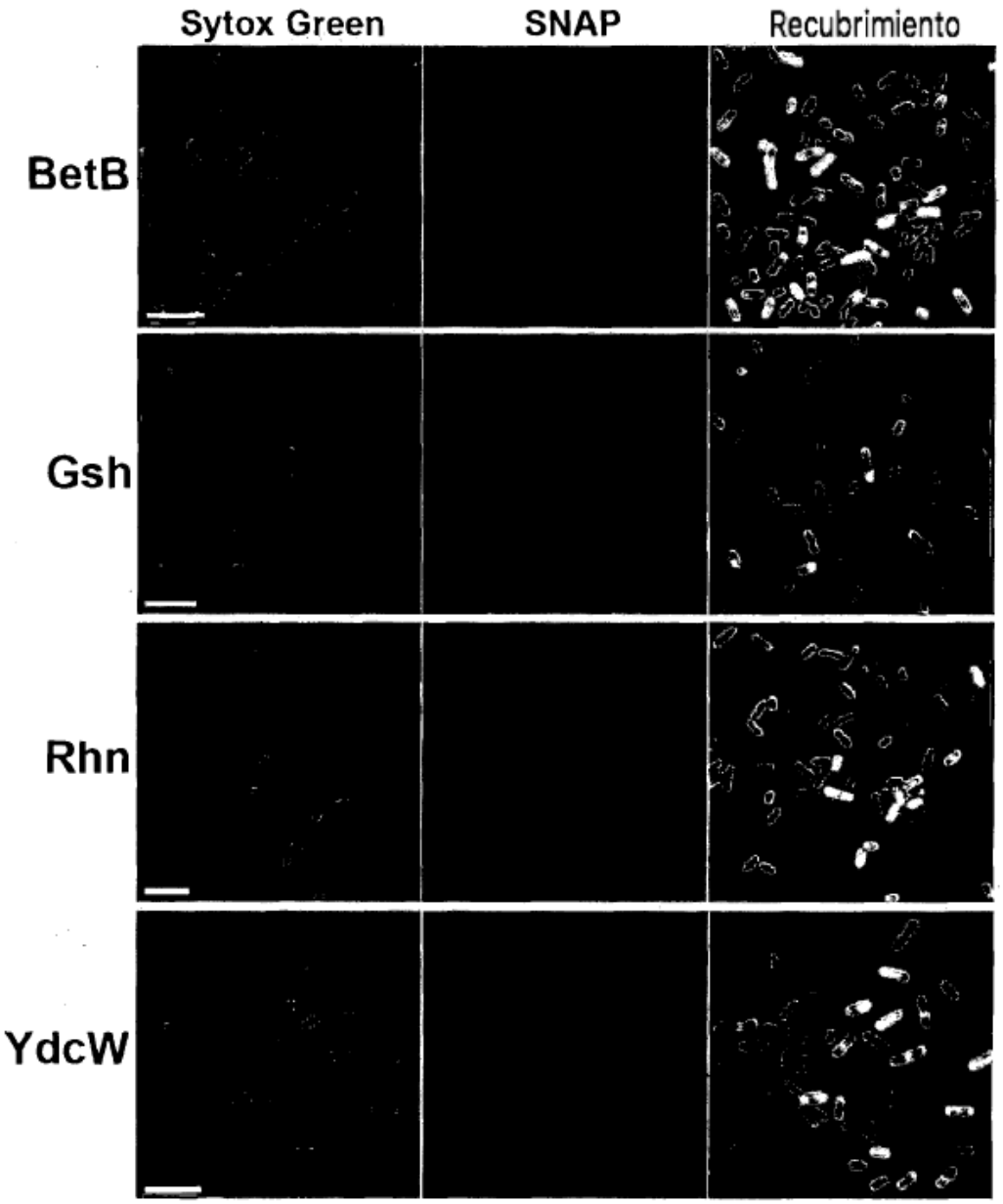

Figura 4

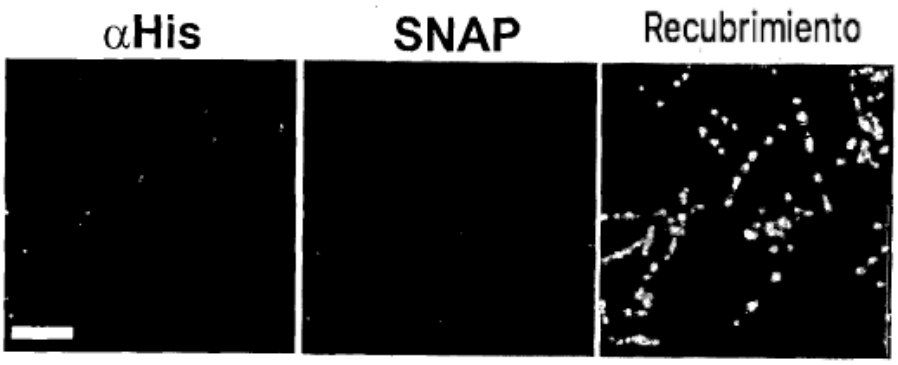

Figura 5

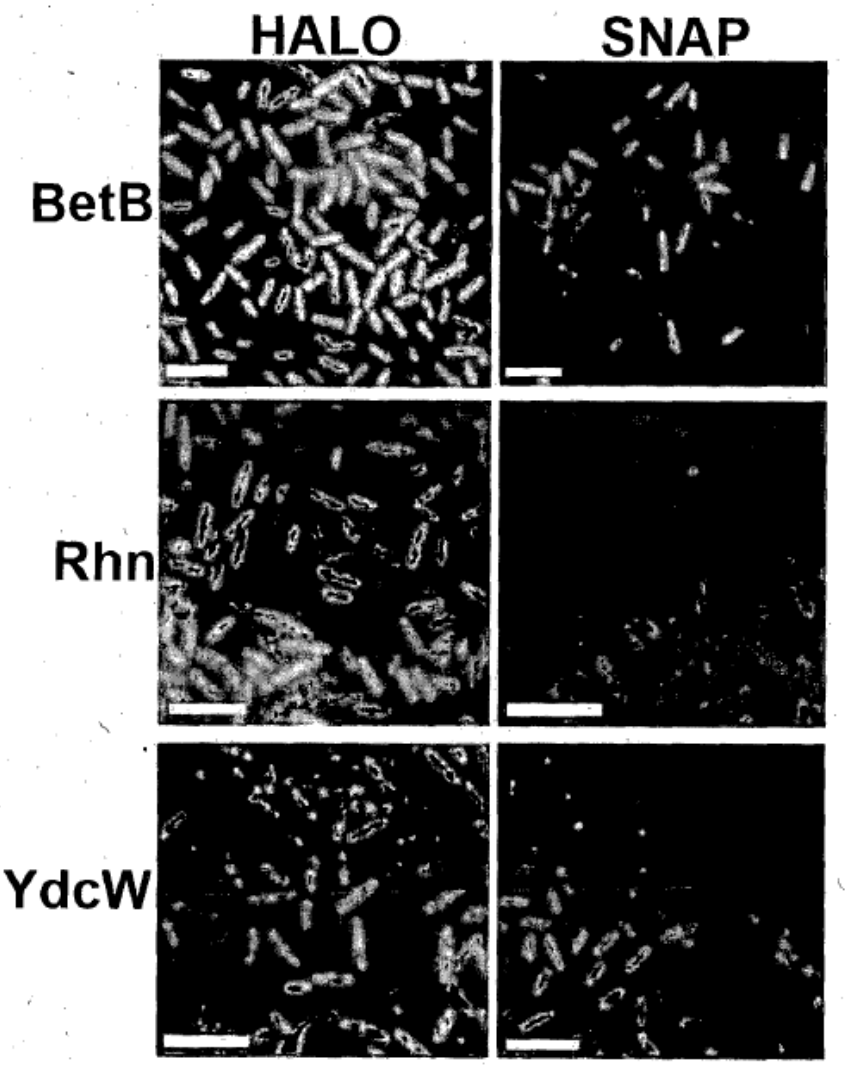

Figura 6

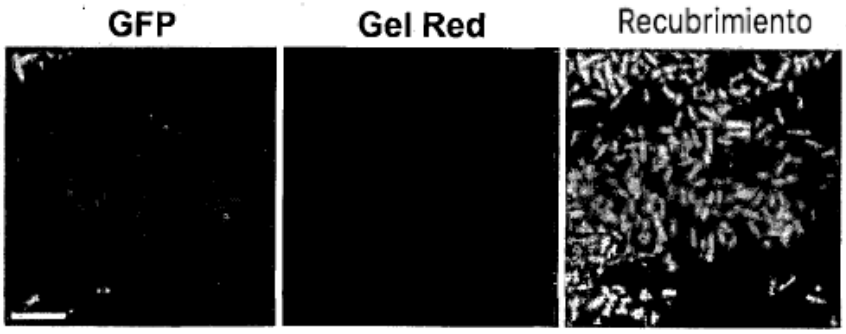

Figura 7

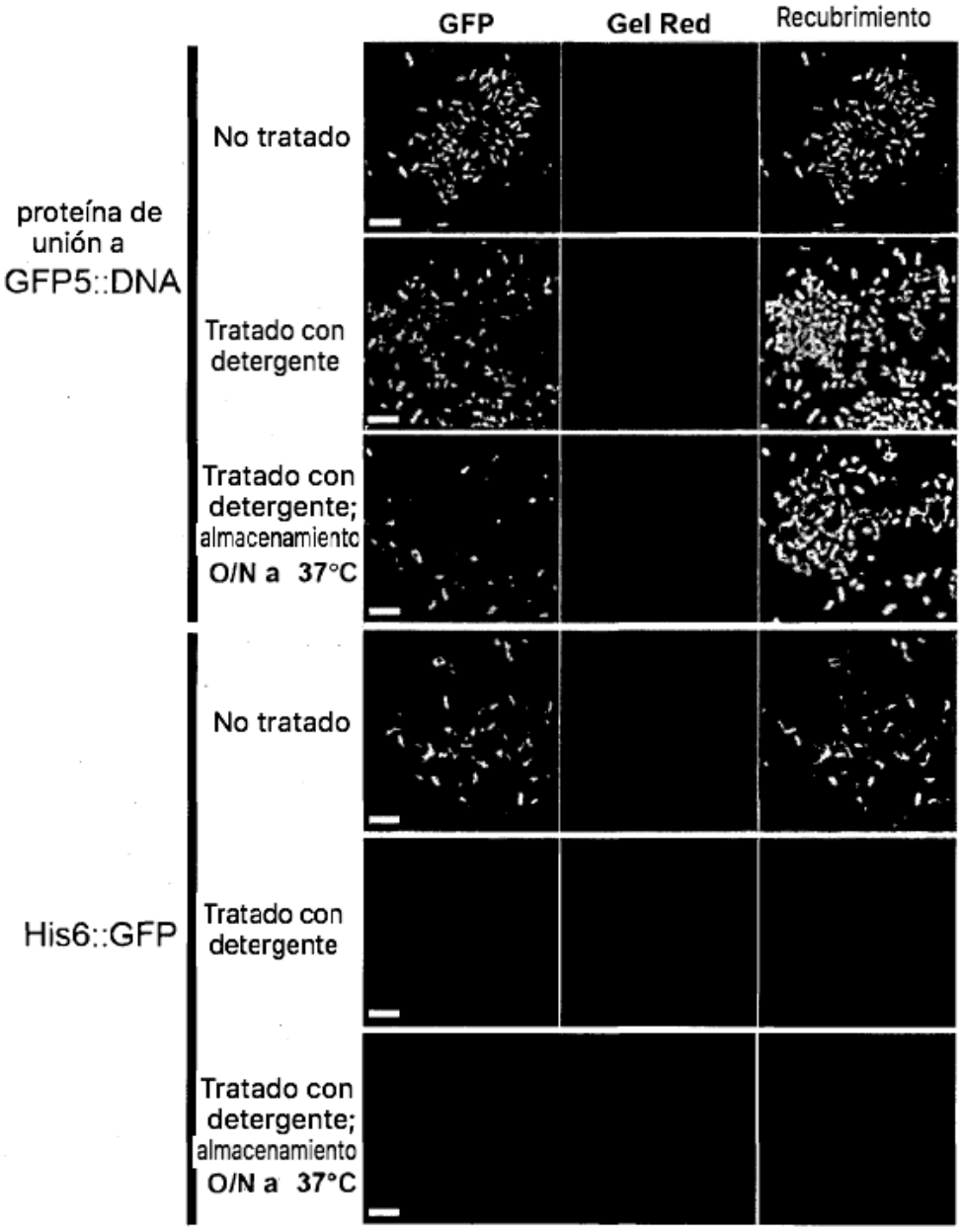
GFP
Gel Red
Recubrimiento
proteína de unión a GFP5::DNA
No tratado
Tratado con detergente
Tratado con detergente; almacenamiento O/N a 37°C
His6::GFP
No tratado
Tratado con detergente
Tratado con detergente; almacenamiento O/N a 37°C

Figura 8

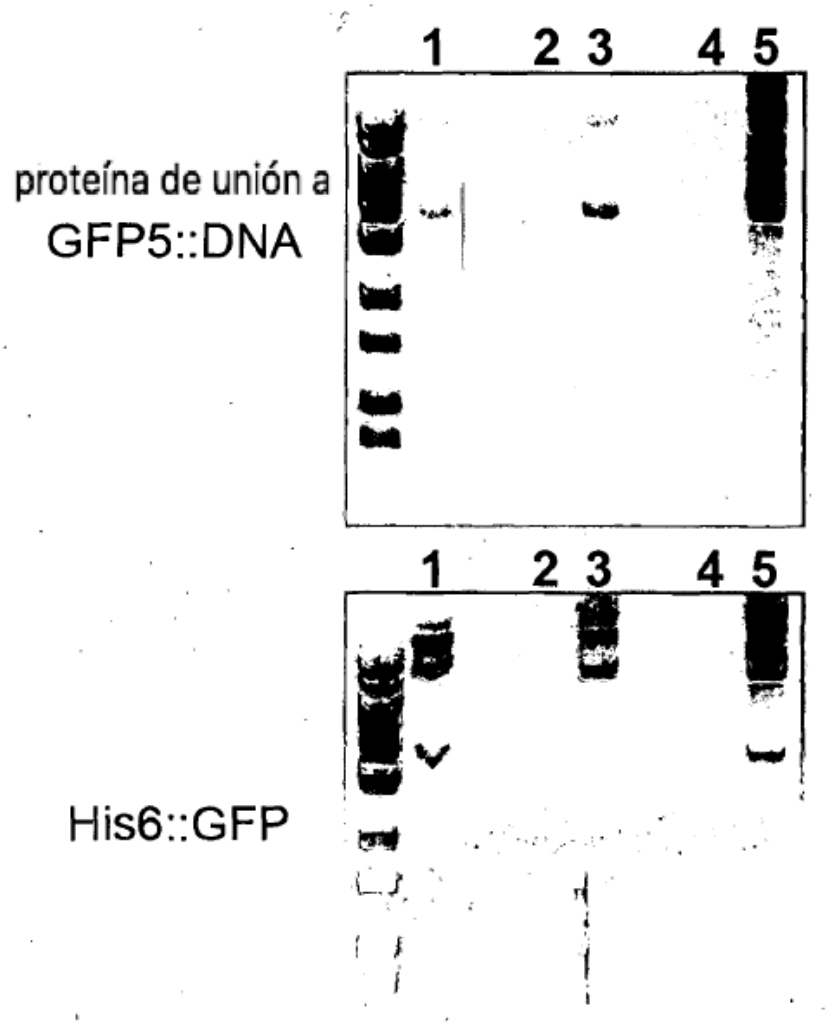

Figura 9

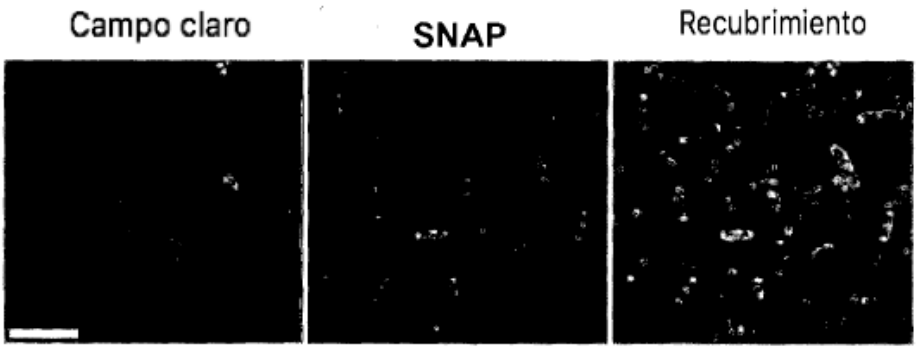

Figura 10

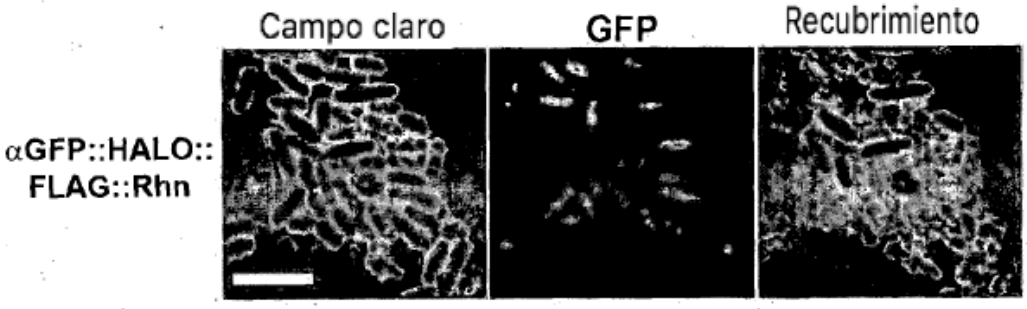

Figura 11

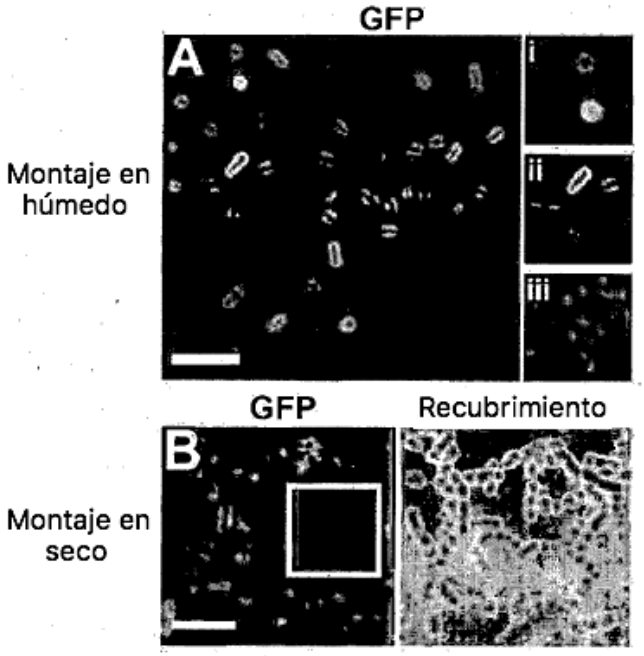
GFP
A
i
ii
iii
Montaje en húmedo
GFP
Recubrimiento
B
Montaje en seco

Figura 12

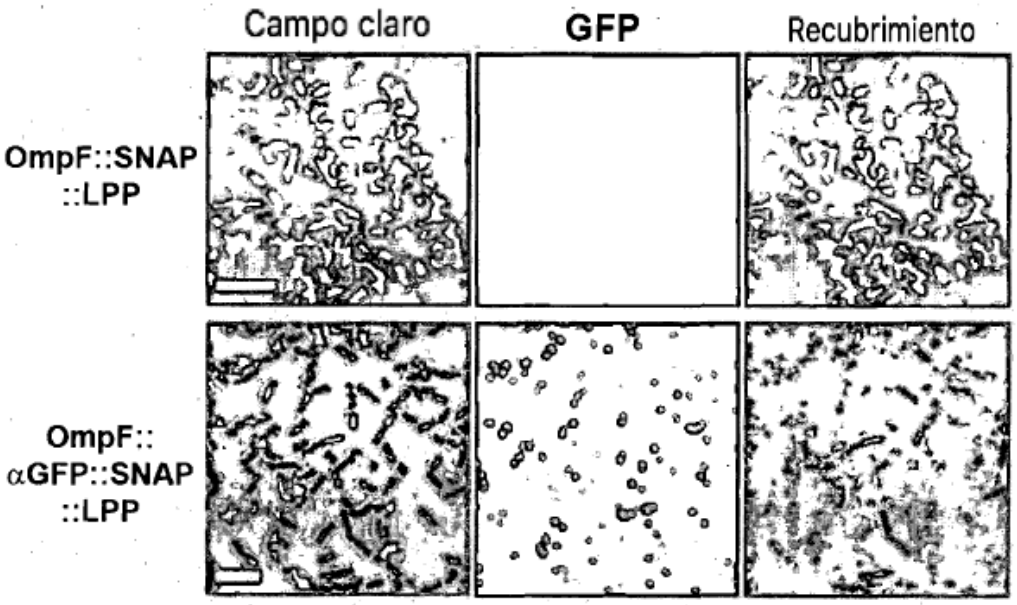
Campo claro
GFP
Recubrimiento
OmpF::SNAP
::LPP
OmpF::
αGFP::SNAP
::LPP

Figura 13

Figura 14

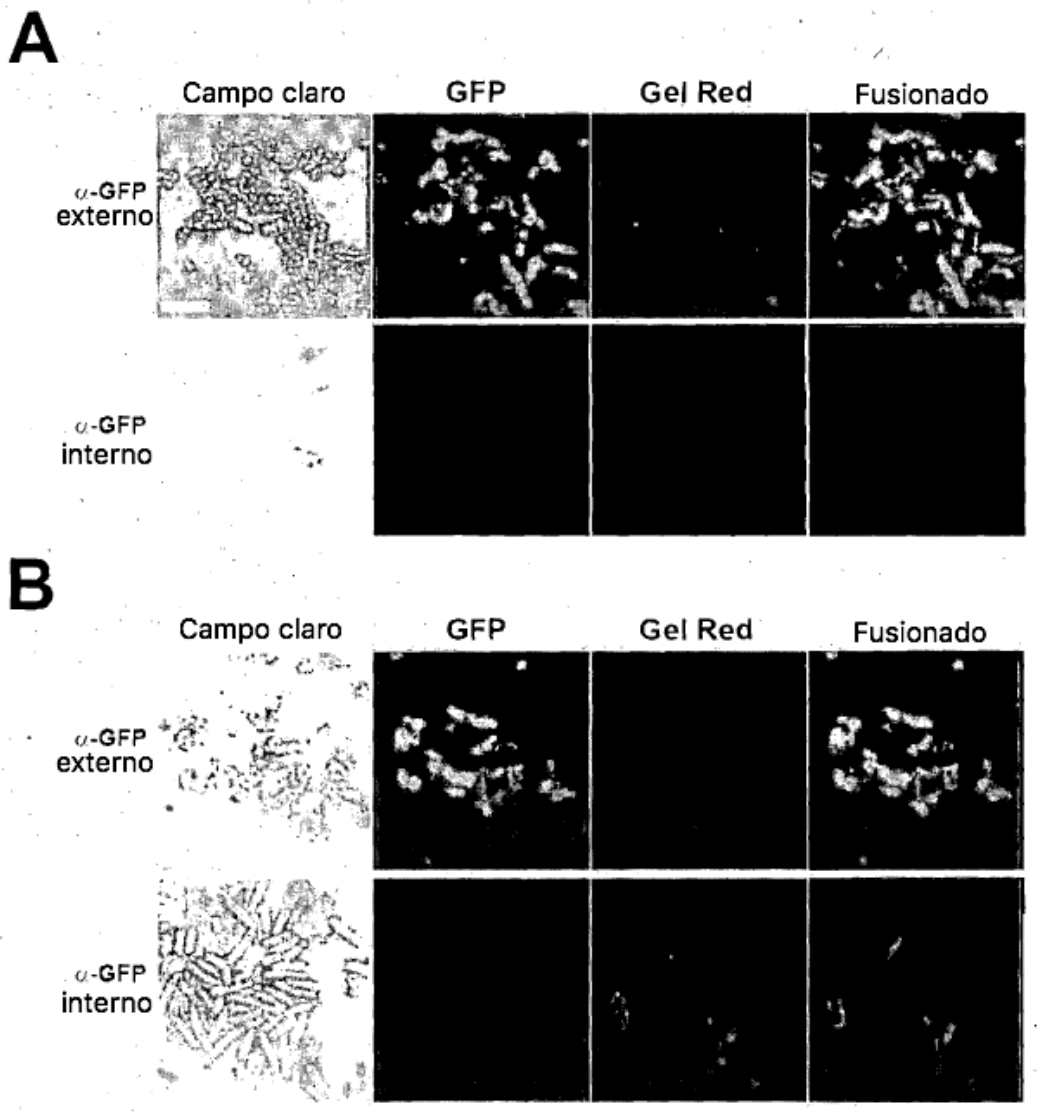
A
Campo claro
GFP
Gel Red
Fusionado
α-GFP externo
α-GFP interno
B
Campo claro
GFP
Gel Red
Fusionado
α-GFP externo
α-GFP interno

Figura 15

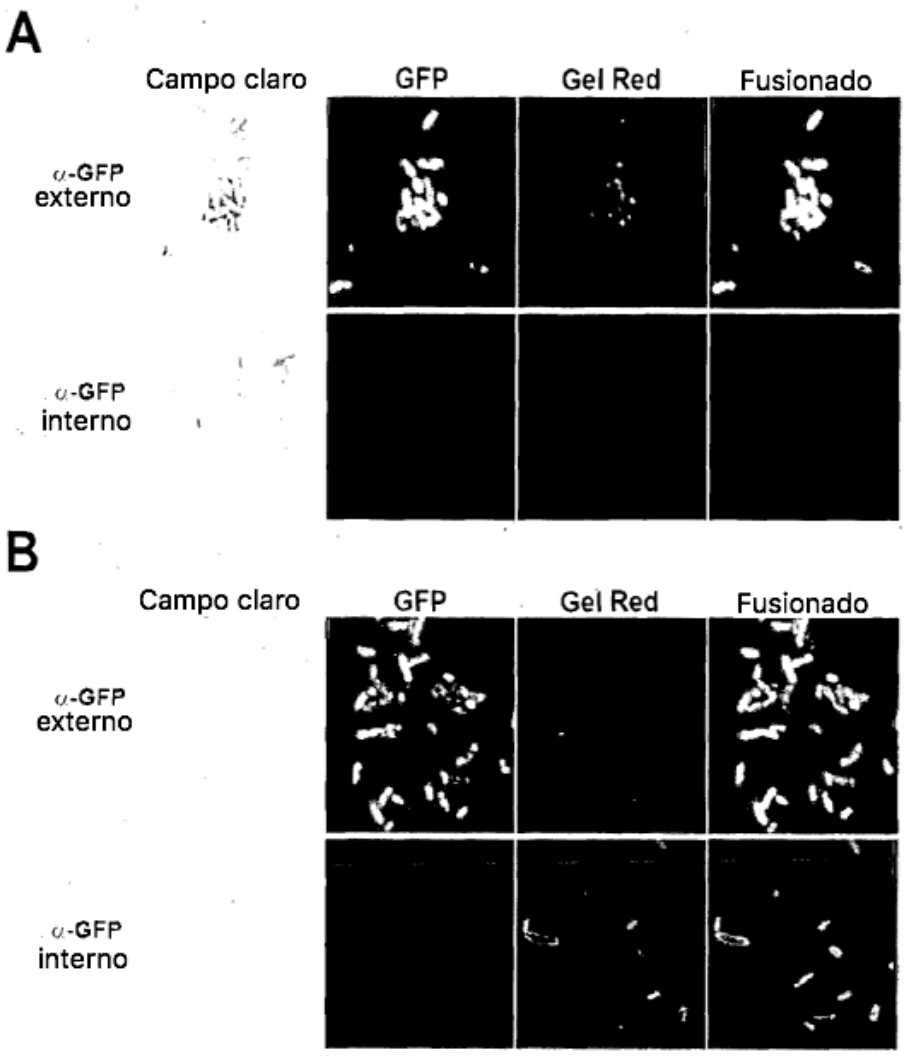
A
Campo claro
GFP
Gel Red
Fusionado
α-GFP externo
α-GFP interno
B
Campo claro
GFP
Gel Red
Fusionado
α-GFP externo
α-GFP interno

Figura 16

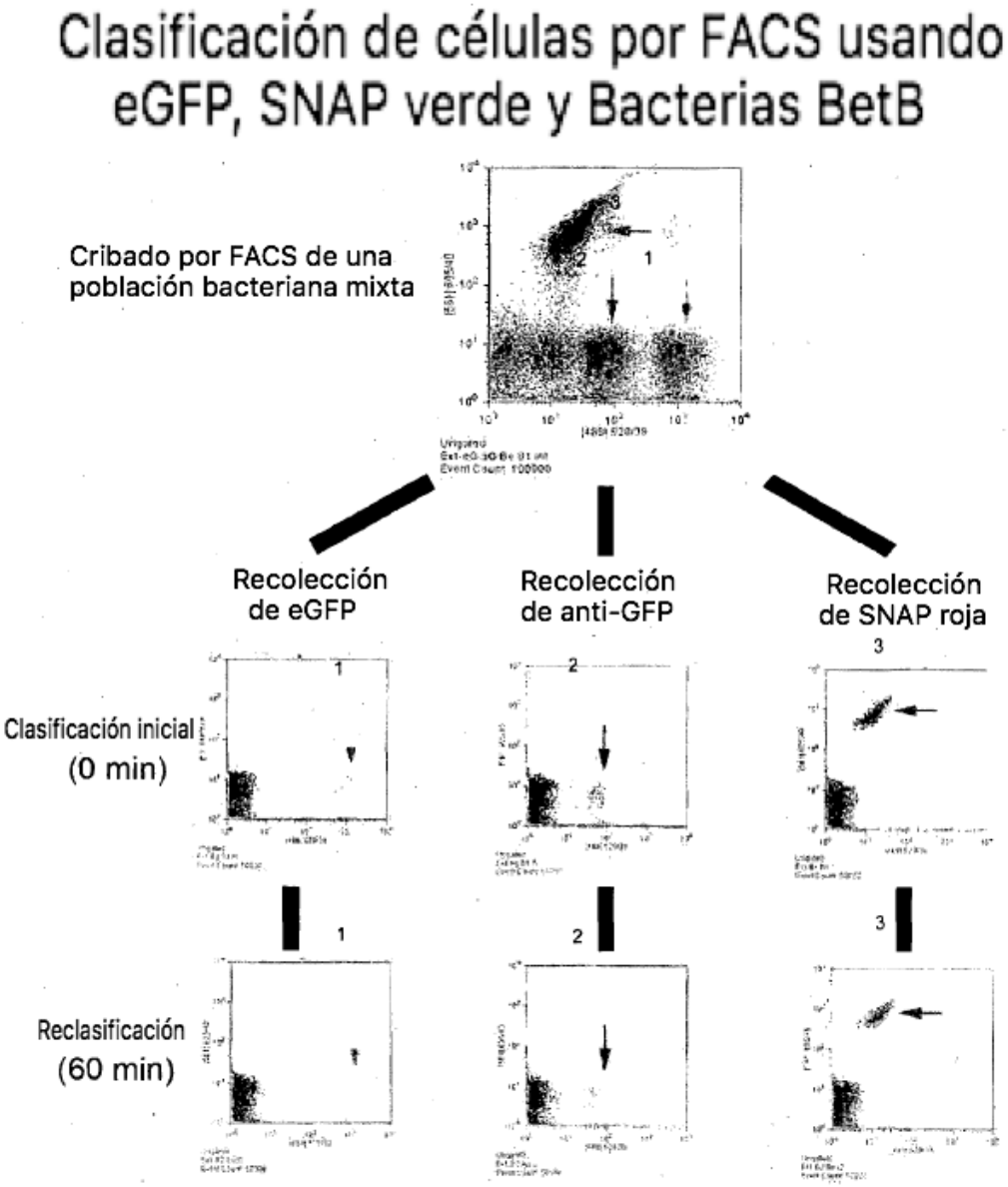
Clasificación de células por FACS usando eGFP, SNAP verde y Bacterias BetB
Cribado por FACS de una población bacteriana mixta
Recolección de eGFP
Recolección de anti-GFP
Recolección de SNAP roja
Clasificación inicial (0 min)
Reclasificación (60 min)

Figura 17

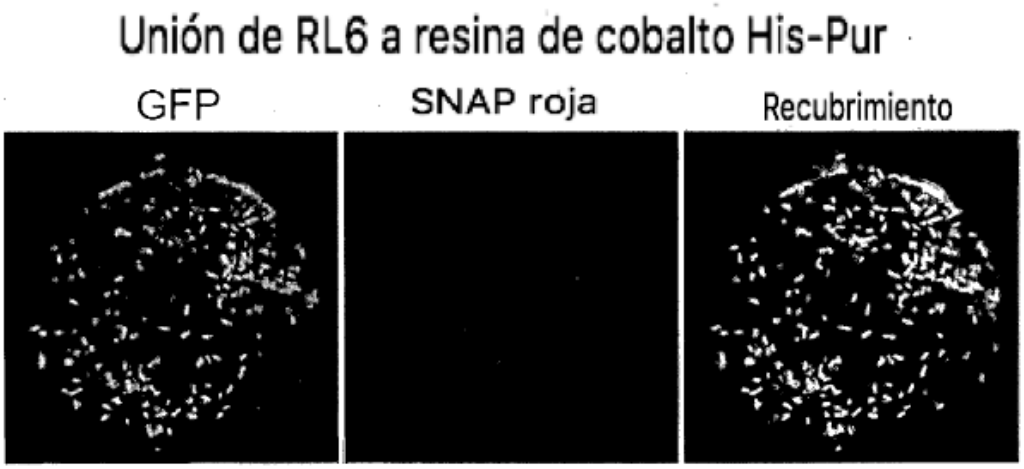
Unión de RL6 a resina de cobalto His-Pur
GFP
SNAP roja
Recubrimiento

Figura 18

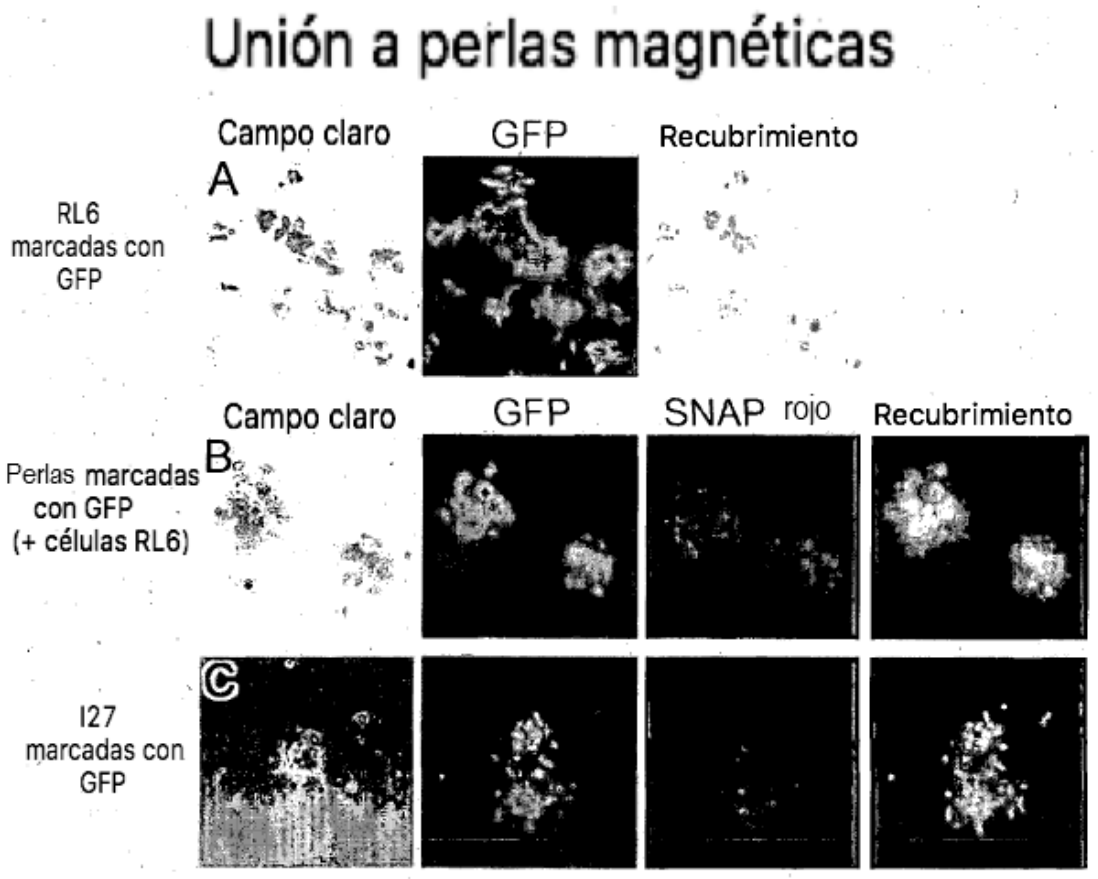
Unión a perlas magnéticas
Campo claro
GFP
Recubrimiento
A
RL6
marcadas con
GFP
Campo claro
GFP
SNAP rojo
Recubrimiento
B
Perlas marcadas
con GFP
(+ células RL6)
C
I27
marcadas con
GFP

Figura 19

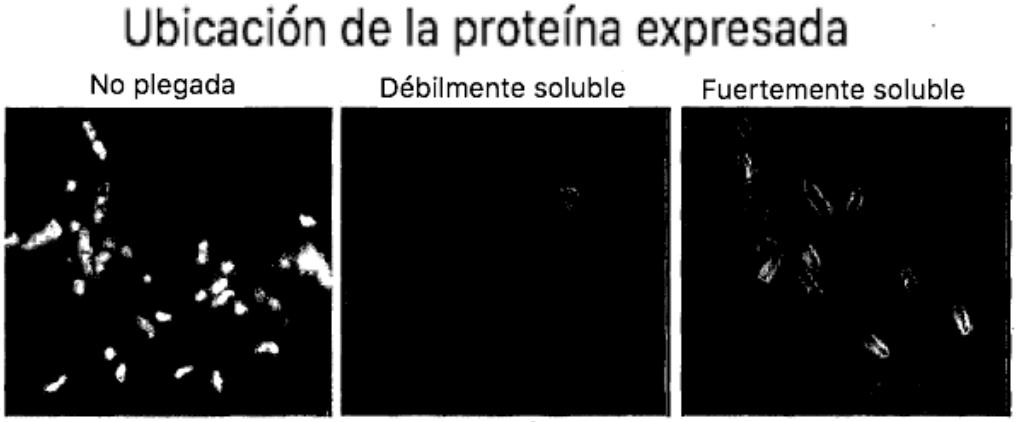
Ubicación de la proteína expresada
No plegada
Débilmente soluble
Fuertemente soluble

Figura 20

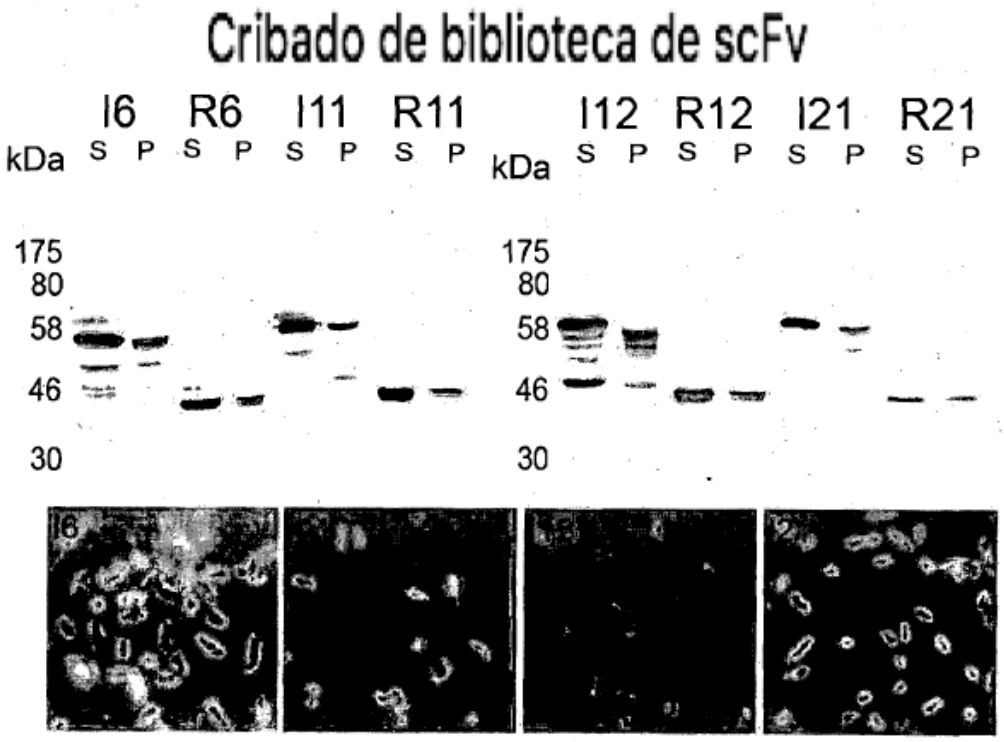
Cribado de biblioteca de scFv
I6 R6 I11 R11
kDa S P S P S P S P
175
80
58
46
30
I12 R12 I21 R21
kDa S P S P S P S P
175
80
58
46
30
I6

Figura 21

A

Permeabilización con Gel Rojo

-ve	+ve
10-30% Etanol	Butanol (1:5)
10-30% Metanol	Cloroformo (1:5)
10-30% Isopropanol	
10-30% DMSO	
10-30% Acetona	
1M Tris	
50mM Tris	

B

Permeabilización con GFP

0.5% 8TGP	Cloroformo (1:5)

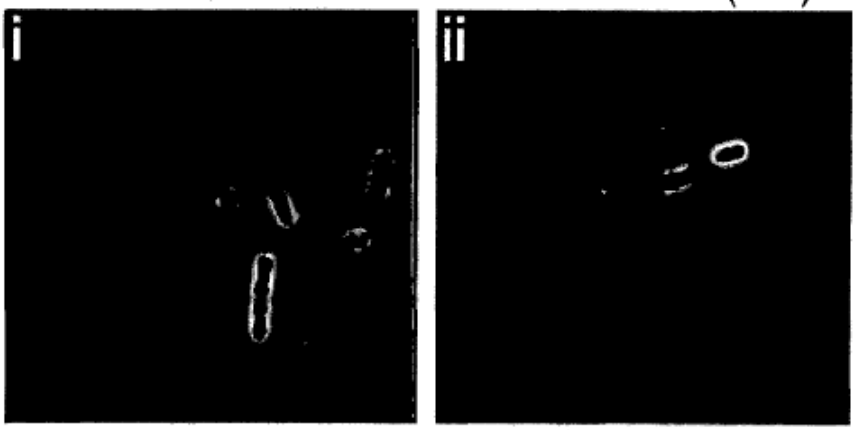

Figura 22

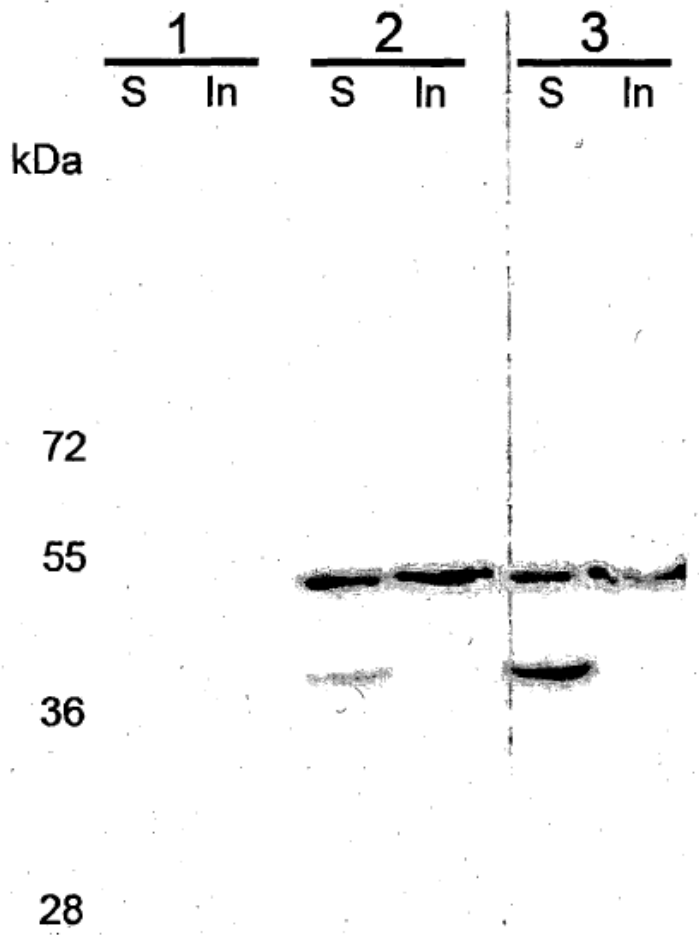

Figura 23

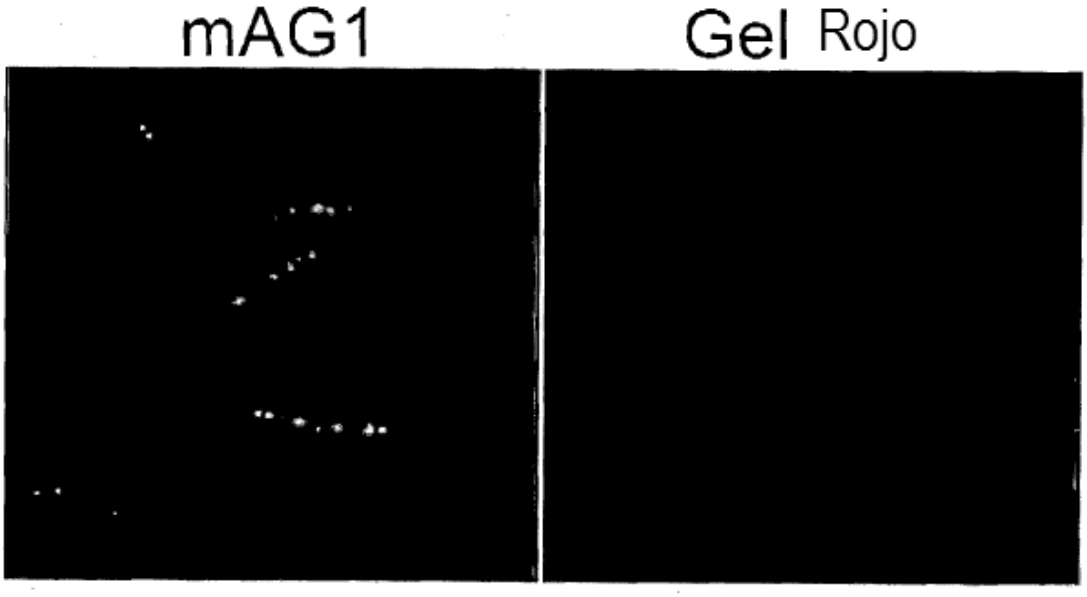

Figura 24

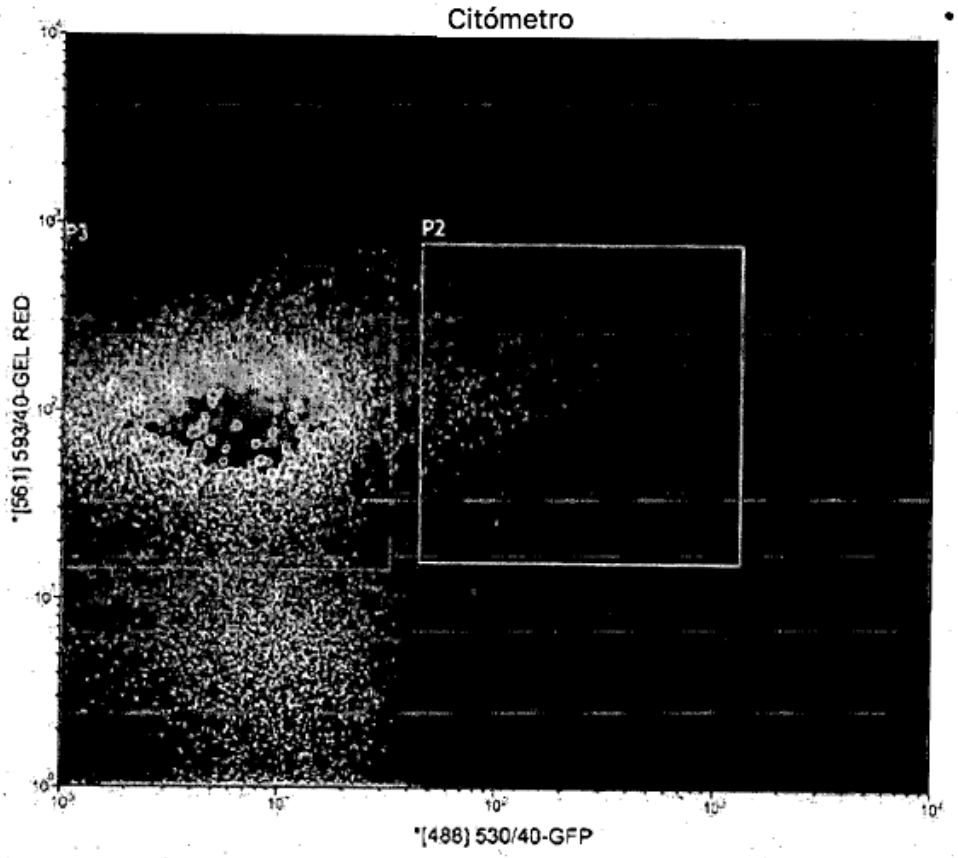

Figura 25