

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 736**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C40B 30/06** (2006.01)

**C40B 50/06** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2013 PCT/EP2013/050330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13104686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2013 E 13700541 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2802656**

54 Título: **Encapsulamiento celular de alto rendimiento para examen o selección**

30 Prioridad:

**09.01.2012 EP 12150453**

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

**10.05.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)  
Prorektorat MNW Rämistrasse 71  
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**SCOTT, DANIEL y  
PLÜCKTHUN, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 611 736 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

Encapsulamiento celular de alto rendimiento para examen o selección

5 La evolución dirigida proporciona proteínas con propiedades mejoradas. Se han aprovechado proteínas evolucionadas como enzimas industriales, moléculas de unión y herramientas de investigación importantes. La etapa crítica en todos los métodos de evolución dirigida es la selección o el examen de bibliotecas de proteínas para detectar fenotipos deseados. Las técnicas de selección permiten la exploración de bibliotecas muy grandes vinculando el fenotipo de una proteína a su genotipo, permitiendo una rápida identificación de variantes interesantes. Los métodos de selección tales como presentación en fagos, presentación en levaduras, presentación bacteriana, presentación de ARNm y presentación de ribosoma están bien establecidos y se usan de manera rutinaria para 10 identificar biomoléculas interesantes a partir de grandes bibliotecas, sin embargo, ninguno de estos métodos es adecuado para la selección de proteínas que dependen de complejas etapas de síntesis o procesamiento intracelulares, o la presencia de estructuras intracelulares para su integridad funcional. Un ejemplo de una clase de proteínas que no pueden obtenerse mediante medios convencionales es el grupo de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Los mutantes de GPCR que son estables en micelas de detergente son un objetivo atractivo para la investigación debido a su importancia en la comprensión de la estructura y bioquímica de GPCR. 15

La presentación bacteriana usa las células bacterianas para contener físicamente una proteína dada y el plásmido que codifica para la misma. Se ha aplicado presentación bacteriana a diferentes GPCR para adquirir mutantes con expresión funcional enormemente mejorada en *E. coli*. Aunque muchos de estos GPCR de alta expresión son más estables en detergente, la correlación entre la alta expresión y la alta estabilidad en micelas de detergente es, en el mejor de los casos, débil. 20

El documento WO 2011/047870 A1 describe un método para encapsular células vivas y marcadores, así como células marcadas encapsuladas y kits para realizar tal encapsulamiento. Las células encapsuladas son útiles en múltiples experimentos de cultivo tisular en paralelo, en los que los marcadores en cada microcápsula pueden usarse para descifrar una trayectoria de células a través de una serie de etapas de cultivo.

25 Abreviaturas usadas en el presente documento son: GPCR (receptor acoplado a proteína G), NT (péptido neurotensina), FACS (clasificación celular activada por fluorescencia), DDM (n-dodecil- $\beta$ -D-maltopiranosido), DM (n-decil- $\beta$ -D-maltopiranosido), OG (n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido), LbL (capa a capa), CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato/hidróxido de N,N-dimetil-3-sulfo-N-[3-[[3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ]-3,7,12-trihidroxi-24-oxocolan-24-il]amino]propil]-1-propanaminio); CHS (sal de Tris de hemisuccinato de colesterol); CHESS (encapsulamiento, solubilización y examen celular de alto rendimiento); HL-NT (péptido neurotensina (8-13) marcado con HiLyte Fluor 647); FL-NT (péptido neurotensina (8-13) marcado con BODIPY FL); FL-prazosina (prazosina marcada con BODIPY FL). 30

La presente invención proporciona un método para seleccionar un conjunto de secuencias de una biblioteca de secuencias de ácido nucleico expresadas. Generalmente procede mediante las siguientes etapas:

35 - se proporciona una pluralidad de células, en la que cada una de las células comprende una secuencia de ácido nucleico expresada, y se expresa esta secuencia de ácido nucleico en la célula y da lugar a una proteína diana,

- se encapsula dicha pluralidad de células en una etapa de encapsulamiento, en la que se tratan las células con un polisacárido catiónico ("etapa de tratamiento catiónico") y con un polisacárido aniónico ("etapa de tratamiento aniónico"), tras lo cual las células se denominan "células encapsuladas",

40 - se solubilizan las células encapsuladas ("etapa de solubilización") de modo que se rompe su membrana para permitir la entrada o salida de pequeñas moléculas (compuestos de bajo peso molecular tales como oligopéptidos) en la célula o fuera de la célula, mientras que las estructuras más grandes tales como proteínas globulares se retienen en la célula; las células ahora encapsuladas y solubilizadas se denominan "compartimentos solubilizados";

- se ponen los compartimentos solubilizados en contacto con

45 ○ un ligando para dicha proteína diana, en el que el ligando porta un marcador detectable, o

○ un indicador de una actividad enzimática de dicha proteína diana, y la actividad enzimática convierte el indicador en un marcador detectable, ("etapa de marcaje");

- se selecciona un subconjunto de los compartimentos solubilizados como función de la cantidad de marcador detectable presente en cada compartimento solubilizado ("etapa de selección"), los compartimentos solubilizados seleccionados se denominan "selección", y 50

- se aíslan las secuencias de ácido nucleico expresadas de la selección como conjunto de secuencias seleccionado ("etapa de aislamiento").

Un ejemplo no limitativo de un polisacárido catiónico es quitosano. El quitosano (n.º CAS 9012-76-4) es un polímero lineal (aleatorio) de  $\beta$ -1-4-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina.

- 5 Un ejemplo no limitativo de un polisacárido aniónico es alginato; otro es ácido hialurónico. El alginato (n.º CAS 9005-32-7) es un copolímero lineal de (1-4)- $\beta$ -D-manuronato y alfa-L-guluronato. El ácido hialurónico (n.º CAS 9004-61-9) es un glicosaminoglicano. Otros polímeros para poner en práctica la invención incluyen, sin limitarse a, poli-L-lisina, carboximetilcelulosa, poli(4-estirenosulfonato de sodio), poli(clorhidrato de alilamina), poliestireno-sulfonato de sodio, poli(estireno-co-estireno-sulfonato de sodio) (NaPSS), PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)), poli(ácido acrílico) o un polímero policatiónico soluble en agua conocido para su uso en la industria de los cosméticos tal como uno de la lista de compuestos de policuaturnio (una designación para diferentes polímeros policatiónicos usados en la industria de los cosméticos; véase la entrada de Wikipedia para "polyquaternium").

- 15 En una realización, la etapa de tratamiento catiónico precede a la etapa de tratamiento aniónico. La capa inicial depende de las propiedades de la superficie del molde. Para *E. coli*, la superficie de la célula está cargada negativamente debido al lipopolisacárido (LPS) que comprende la cara externa de la membrana exterior. Esto hace que la célula pueda someterse a recubrimiento inicial con un polímero cargado positivamente. El orden del procedimiento puede invertirse (es decir, se aplica en primer lugar la capa cargada negativamente) si una célula particular tiene una superficie cargada positivamente.

- 20 En una realización, la etapa de encapsulamiento procede a lo largo de varias rondas, repitiendo la secuencia de recubrimiento aniónico y catiónico. Por tanto, la etapa de tratamiento catiónico seguida por una etapa de tratamiento aniónico pueden repetirse, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces, dando lugar a cápsulas cada vez más gruesas.

- 25 La etapa de solubilización rompe la pared celular o la membrana exterior (y la membrana interior en el caso de bacterias gram-negativas tales como *E. coli*) y expone el interior de la célula, mientras que el recubrimiento aplicado a la célula durante la etapa de encapsulamiento retiene estructuras más grandes en la célula para analizarse con sonda en etapas posteriores. El límite de tamaño puede afinarse ajustando los polielectrolitos usados (peso molecular) y la cantidad de capas depositadas en la etapa de encapsulamiento. Esto permite "afinar" el método de la invención para permitir la retención de una proteína particular de interés; asimismo permite proporcionar la entrada de un tamaño particular de sonda o ligando en la célula.

- 30 La etapa de solubilización puede emplear cualquier método que no rompa las capas poliméricas recubiertas sobre la célula durante la etapa de encapsulamiento. Los ejemplos incluyen: tratamiento con detergente con perforina, lisozima, tratamiento leve con ultrasonidos, choque hiperosmótico o hipoosmótico, electroporación, tratamiento con alcohol, ciclos de congelación-descongelación, calentamiento y ebullición de las cápsulas y gradientes de presión.

- 35 En algunas realizaciones, solubilizar la membrana de dichas células encapsuladas en una etapa de solubilización, dando lugar a una pluralidad de compartimentos solubilizados, comprende la etapa de exponer dicha pluralidad de células encapsuladas a un detergente en disolución acuosa.

Por tanto, en algunas realizaciones el método de la invención comprende

- proporcionar una pluralidad de células bacterianas, comprendiendo cada célula una secuencia de ácido nucleico expresada, expresada como una proteína diana en cada célula,
- 40 - encapsular dicha pluralidad de células en una etapa de encapsulamiento, que comprende
- o tratar dicha pluralidad de células bacterianas con un polisacárido catiónico en una etapa de tratamiento catiónico,
  - o tratar dicha pluralidad de células bacterianas con un polisacárido aniónico en una etapa de tratamiento aniónico,
- 45 dando lugar dicha etapa de encapsulamiento a una pluralidad de células bacterianas encapsuladas,
- solubilizar la membrana de dichas células bacterianas encapsuladas con un detergente en una etapa de solubilización, dando lugar a una pluralidad de compartimentos solubilizados,
- poner dicha pluralidad de compartimentos solubilizados, en una etapa de marcaje, en contacto con

- o un ligando para dicha proteína diana, portando dicho ligando un marcador detectable, o con
- o un indicador de una actividad enzimática de dicha proteína diana, convirtiendo dicha actividad enzimática dicho indicador en un marcador detectable,

5 - seleccionar un subconjunto de dicha pluralidad de compartimentos solubilizados como función de marcador detectable presente en dichos compartimentos solubilizados en una etapa de selección, dando lugar a una selección, y

- aislar dichas secuencias de ácido nucleico expresadas de la selección como un conjunto de secuencias seleccionado en una etapa de aislamiento.

10 En una realización, se tratan células *E.coli* encapsuladas que expresan GPCR localizados en la membrana celular interior durante varias horas con una disolución acuosa de n-decil-β-D-maltopiranosido al 2%, un detergente que solubiliza las membranas celulares. De este modo, se retiran moléculas de receptor de la membrana celular y se solubilizan en micelas de n-decil-β-D-maltopiranosido dentro del compartimento solubilizado. También se han usado otros detergentes tales como DDM, OG, CHAPS y mezclas de cualquiera de estos (véanse los ejemplos).

15 Según una alternativa de la etapa de marcaje, los compartimentos solubilizados se ponen en contacto con un ligando para la proteína diana, y el ligando porta un marcador detectable. El ligando que se pone en contacto con los compartimentos solubilizados puede entrar en el compartimento solubilizado a través de la perforación u orificios en la pared celular o membrana exterior (si queda alguna) y a través del encapsulamiento recubierto sobre la célula en la etapa de encapsulamiento, para analizar con sonda la proteína diana retenida dentro del compartimento solubilizado.

20 Ejemplos no limitativos para un ligando para poner en práctica la invención son un oligopéptido, un agonista o antagonista enzimático (alostérico) o agonista o antagonista de canal de iones, agonista o antagonista de receptor, agonista inverso y modulador alostérico. El ligando también puede ser un sustrato enzimático o un análogo de estado de transición que se une a una variante de la proteína diana. Otros ejemplos no limitativos de ligandos son moléculas de unión específica tales como anticuerpos, DARPin (véase el documento US20120142611 (A1),  
25 incorporado como referencia en el presente documento), FAB, nanocuerpos o fragmentos variables de cadena sencilla (scFv). Dependiendo del tamaño de los poros del recubrimiento de membrana solubilizada y el número de capas poliméricas añadidas, también pueden usarse proteínas (polipéptidos) funcionales como ligandos.

30 Según otra alternativa de la etapa de marcaje, los compartimentos solubilizados se ponen en contacto con un indicador de una actividad enzimática de la proteína diana. La actividad enzimática convierte el indicador en un colorante (que tras la conversión tiene un espectro de absorción o de fluorescencia diferente del indicador antes de la conversión) que sirve como marcador detectable, permitiendo la detección y selección adicional de la célula o el compartimento. Por tanto, según esta alternativa, la etapa de marcaje es independiente del ligando, por ejemplo, puede usarse un indicador redox genérico para detectar la actividad de peroxidasas. A modo de ejemplo no  
35 limitativo, la actividad de fumarato reductasa puede detectarse en un compartimento solubilizado en presencia de detergente. Se encapsulan células que expresan fumarato reductasa o fumarato reductasa mutada y se solubilizan los compartimentos con detergente. Después se añade bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT) soluble en agua a los compartimentos solubilizados, en los que entra en el compartimento y cualquier fumarato reductasa activa reduce el MTT para dar formazán insoluble de color púrpura. El precipitado de formazán permanece dentro del compartimento solubilizado y su presencia en compartimentos particulares puede detectarse y  
40 aislarse usando citometría de flujo (FACS).

En una realización, el marcador detectable es un colorante fluorescente. Ejemplos no limitativos de colorantes fluorescentes son diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), colorantes de xanteno tales como 5 ó 6-carboxifluoresceína (5-FAM y 6-FAM) o fluoresceína, colorantes de rodamina tales como 5 ó 6-carboxitetrametilrodamina (5 ó 6-TAMRA), o colorantes de cianina.

45 La etapa de selección puede proceder mediante cualquier método que permita la distinción de las células o los compartimentos mediante la cantidad o calidad del marcador en los mismos. Para marcadores fluorescentes, FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) es el método de elección.

50 En una realización, se somete el conjunto de secuencias seleccionado a otra ronda de selección según el método de la invención. Por tanto, se subclona el conjunto de secuencias seleccionado y se transfecta en células de nuevo, y se somete a la secuencia de etapa de encapsulamiento, etapa de solubilización, etapa de marcaje, etapa de selección y etapa de aislamiento, una o varias veces. La repetición puede aplicarse al conjunto de secuencias seleccionado de la repetición anterior sin manipulación adicional del conjunto de secuencias seleccionado. En una realización, se muta el conjunto de secuencias seleccionado, por ejemplo, mediante PCR propensa a errores (Chen & Arnold, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1993, 90:5618-5622). Este método introduce mutaciones puntuales, altera la

secuencia en pequeñas etapas sin alterar sustancialmente la longitud de ninguna secuencia individual, añadiendo "ruido" al conjunto de secuencias seleccionado para introducir mutaciones a partir de las cuales pueden elegir rondas posteriores de selección. Alternativas o complementos son mutagénesis por saturación o intercambio de ADN (Stemmer, Nature 1994, 370:389-391; Miyazaki & Arnold, J. Mol. Evol. 1999, 49: 716-720).

5 Alternativamente, en una realización, el conjunto de secuencias seleccionado se somete a un tratamiento que delecta tramos de secuencia, recombina o intercambia tramos de secuencia entre secuencias seleccionadas, o introduce nuevos tramos de secuencia de manera aleatoria. Tal manipulación es equivalente a la recombinación en un entorno fisiológico y permite "saltos" mayores en el espacio evolutivo. En una realización, se combinan tanto mutación puntual como recombinación. Por tanto, el conjunto de secuencias seleccionado se diversifica mediante  
10 amplificación de dichas secuencias de ácido nucleico expresadas mediante un procedimiento que introduce mutaciones en la secuencia amplificada, y/o mediante deleción o inserción de tramos de secuencia en dichas secuencias de ácido nucleico expresadas, y posteriormente, se somete el conjunto de secuencias seleccionado a otra secuencia de etapa de encapsulamiento, etapa de solubilización, etapa de marcaje, etapa de selección y etapa de aislamiento. Se revisan métodos para introducir variantes de secuencias por Dalby (Curr. Opin. Struct. Biology  
15 2011, 21, 473-480) y referencias citadas en el mismo.

La biblioteca de secuencias de ácido nucleico expresadas puede ser una biblioteca aleatoria o una biblioteca compuesta por secuencias homólogas, o secuencias que se expresan en determinadas células, tejidos, estados patológicos, o relacionadas de cualquier otra manera con un parámetro de interés. En una realización, la biblioteca de secuencias de ácido nucleico expresadas está compuesta por secuencias homólogas con una identidad en  
20 porcentaje del 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más entre sí.

La identidad en el contexto de la presente invención es un parámetro cuantitativo individual que representa el resultado de una comparación de secuencias posición por posición. En la técnica se conocen métodos de comparación de secuencias; el algoritmo BLAST públicamente disponible es un ejemplo.

En la mayoría de las realizaciones, la secuencia de ácido nucleico expresada es parte de un constructo de expresión de transgenes presente en la(s) célula(s), por ejemplo, un plásmido de expresión. En una realización, la secuencia de ácido nucleico expresada es genómica y la pluralidad de células es una población de mutantes. En una  
25 realización, la pluralidad de células es una mezcla heteróloga de tipos de células u organismos. Esto permite buscar fenotipos poco frecuentes, por ejemplo, enzimas hiperestables en muestras de organismos derivadas del medio ambiente.

30 La proteína diana puede ser cualquier proteína expresada en la célula y retenida en el compartimento solubilizado tras el encapsulamiento y la solubilización. Un ejemplo no limitativo importante es una proteína de receptor acoplada a proteína G. Otros ejemplos no limitativos incluyen canales de iones, enzimas, receptores nucleares, factores de transcripción y proteínas de unión a ADN/ARN. Otros ejemplos de proteínas diana son moléculas de unión específica tales como anticuerpos, DARPin, FAB, nanocuerpos o fragmentos variables de cadena sencilla (scFv).  
35 Las proteínas diana de bajo peso molecular se retienen en los compartimentos solubilizados mediante fusión con otros oligopéptidos o proteínas para formar estructuras más grandes (por ejemplo, una etiqueta de GFP triple), o mediante reducción del tamaño de poro eficaz del compartimento solubilizado mediante un aumento del número de capas poliméricas.

En principio, puede usarse cualquier clase de célula (en el significado biológico de la palabra). Por tanto, el término célula en el contexto de la presente memoria descriptiva incluye células bacterianas (gram-positivas y gram-negativas), células eucariotas incluyendo células vegetales, células de mamífero incluyendo células adaptadas de cultivo de células de mamífero, o cualquier otra célula que puede someterse a las etapas de encapsulamiento y rotura posterior de la contención natural de la célula. Los ejemplos mostrados en el presente documento hacen uso de células bacterianas; sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a células bacterianas.  
40

45 En una realización, las células son células bacterianas. En una realización, las células son células de mamífero en suspensión aisladas en cultivo celular. En una realización, las células son células vegetales en suspensión aisladas en cultivo celular.

En una realización, el marcador detectable es un colorante fluorescente y dicha etapa de selección se logra mediante clasificación celular fluorescente.

50 En una realización, las células son células de *E. coli*, la proteína diana es un receptor acoplado a proteína G y el marcador detectable es un colorante fluorescente.

Siempre que se exponen alternativas para características separables individuales tales como, por ejemplo, una célula, una proteína diana, un polisacárido catiónico, un polisacárido aniónico, un marcador detectable o un protocolo de selección, en el presente documento como "realizaciones", debe entenderse que tales alternativas

pueden combinarse libremente para formar realizaciones diferenciadas de la invención dada a conocer en el presente documento.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, de los que pueden derivarse realizaciones y ventajas adicionales:

## 5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una representación esquemática de una realización de la invención. Se transforma una biblioteca de mutantes de receptor y se expresa en *E. coli*. Se encapsulan células y se permeabiliza la membrana celular con detergente. La capa de encapsulamiento sirve como barrera semipermeable, reteniendo el receptor solubilizado y su plásmido codificante dentro de la cápsula, pero permitiendo que el ligando marcado con fluorescencia entre en la cápsula en la que puede unirse a moléculas de receptor funcional. Las cápsulas que contienen mutantes de GPCR estables frente a detergente son más fluorescentes y pueden clasificarse de la población con FACS. Se recupera material genético de las cápsulas clasificadas y se usa o bien para identificar mutantes de receptor deseados o bien como molde para rondas adicionales de mutación o selección.

La figura 2 muestra una representación esquemática del encapsulamiento LbL de células de *E. coli* y la optimización de este método para la presente invención. (a) Se encapsularon células de *E. coli* depositando capas alternantes de polímero de quitosano cargado positivamente y alginato cargado negativamente. (b) La cantidad de células agregadas producidas durante el procedimiento LbL de "Hillberg" se redujo en gran medida mediante la adición de EDTA (+EDTA) a las disoluciones de encapsulamiento de alginato y quitosano. (c) La reducción del pH de las disoluciones de encapsulamiento por debajo de 7 dio como resultado cápsulas más fuertes que podían resistir el tratamiento con detergente.

La figura 3 muestra la caracterización de células encapsuladas. Se encapsularon células de *E. coli* que expresaban GPCR con 1 capa de quitosano y 1 capa de alginato por triplicado y se analizaron con FACS. (a) Las propiedades de dispersión de láser de las células desnudas permitieron la definición de un cerco arbitrario que abarcaba el 91,4% de las células individuales. (b) El 60,5% de las partículas detectadas en la muestra de células encapsuladas se encontraban dentro de este cerco, mostrando la mayor parte de las partículas restantes propiedades de dispersión características de partículas más grandes. (c) Se expusieron células desnudas y encapsuladas a detergente (DDM al 1%, CHAPS al 0,6%, CHS al 0,12%) y se sometió a ensayo la pérdida de partículas de tipo célula a lo largo del tiempo con FACS. El tratamiento con detergente de células desnudas dio como resultado una pérdida rápida de partículas de tipo célula (círculos huecos negros), mientras que la muestra de células encapsuladas tratadas con detergente (cuadrados huecos grises) mantuvo una alta proporción de nanopartículas de tipo célula a lo largo del periodo de 15 días. Las células desnudas sin tratar (triángulos rellenos negros) y las células encapsuladas sin tratar (cuadrados rellenos grises) mantuvieron ambas una alta proporción de partículas de tipo célula a lo largo del tiempo. (d) Se encapsularon células que expresaban D03 y C7E02 marcadas con etiqueta de sfGFP en el extremo C-terminal y se expusieron a una mezcla de detergente suave (SAB) o detergente duro (DM) en presencia de HL-NT. Se midió la fluorescencia de sfGFP contenida dentro de las cápsulas usando FACS durante 15 días. No se observó ninguna reducción significativa en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en el canal de sfGFP en las muestras, lo que indica que los receptores expresados no se fugaban de las nanocápsulas. (e) A la inversa, el nivel promedio de ligando unido por cápsula varió más a lo largo del experimento de 15 días. Tal como se esperaba, la actividad de D03 en DM se redujo a lo largo del tiempo. La fluorescencia de las muestras de C7E02 tendió a aumentar a lo largo de los 2 primeros días antes de volver al nivel inicial tras 15 días, lo que indica que este mutante todavía podía unirse a ligando.

La figura 4 muestra imágenes de microfotografías electrónicas de células encapsuladas. Se visualizaron (a) células de *E. coli* desnudas, (b) células encapsuladas y (c) células encapsuladas tratadas con DDM al 1% durante 24 h con microscopía electrónica de transmisión.

La figura 5 muestra la selección de miembros de la biblioteca 303 estables frente a detergente. Se seleccionaron miembros de "biblioteca 303" estables frente a detergente con FACS. (a) Los histogramas de fluorescencia de las poblaciones clasificadas revelaron un fuerte enriquecimiento de receptores estables frente a detergente. (b) Se expresaron individualmente 22 clones seleccionados, se solubilizaron y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de unión a ligando tras 2 ó 100 h en OG. Se expresaron los 3 mejores receptores y se solubilizaron en DM al 1,7% durante 3 h a 20°C. Se capturaron los receptores solubilizados a partir del sobrenadante con perlas paramagnéticas de estreptavidina a 4°C durante 1 h. (c) O bien se trataron perlas recubiertas con C7E02 (círculos grises), 303OGB5 (cuadrados negros), 303OGG7 (círculos negros) o 303OGG8 (triángulos negros) con HL-NT(8-13) 20 nM en DM al 1,7% durante 1 h antes de la exposición térmica durante 30 min a temperaturas crecientes o bien (d) se trataron con HL-NT(8-13) 20 nM tras el calentamiento en ausencia de ligando. (e) Alternativamente, tras la solubilización en DM al 1,7%, se lavaron las perlas recubiertas con receptor durante 15 min en OG al 2% a 4°C sin ligando antes de o bien exponerse a HL-NT(8-13) 20 nM en OG al 2% durante 1 h y después de la exposición térmica durante 30 min a temperaturas crecientes o bien (f) tratarse con HL-NT(8-13) 20 nM tras el calentamiento en ausencia de ligando. No pudo medirse ninguna señal específica a partir de perlas recubiertas con C7E02 en OG al

2%. Se tomaron medidas paralelas en cada punto de temperatura en presencia de NT(8-13) 5  $\mu$ M como agente de competencia para determinar la señal de fluorescencia específica. Los puntos de datos se representan gráficamente como la media de medidas por duplicado, el 100% representa la señal medida tras calentar a 20°C durante 30 min. Las barras de error indican el error estándar de la media.

5 La figura 6 muestra el método usado para caracterizar miembros de la biblioteca 303 seleccionados.

La figura 7 muestra las secuencias de aminoácidos de miembros de la biblioteca 303 seleccionados altamente estables. Las secuencias de aminoácidos de los receptores seleccionados se alinearon con NTS1 de rata original, D03 y el clon de alta expresión C7E02. Las ubicaciones de las hélices transmembrana se indican con cilindros mientras que el número de mutaciones con respecto a D03 se muestra en la columna  $\Delta$ .

10 La figura 8 muestra la selección de mutantes de ADRA1A estables frente a detergente con CHESS. Se seleccionaron miembros de la biblioteca ADRA1A estables frente a detergente con FACS usando BODIPY FL-prazosina 200 nM. (a) Se expresaron individualmente 21 clones seleccionados, se solubilizaron y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de unión a ligando tras 3 horas en PBS-E (DCC). (b) Se solubilizaron los 4 mejores receptores en PBS-E (DCC) durante 3 h a 20°C en ausencia de ligando. Se capturaron los receptores solubilizados a partir del sobrenadante con perlas paramagnéticas de estreptavidina a 4°C durante 1 h. O bien se trataron perlas recubiertas con ADRA1ADCCA3 (círculos negros), ADRA1ADCCG4 (cuadrados huecos grises), ADRA1ADCCD7 (cruces negras) o ADRA1ADCCD8 (círculos huecos grises) con [<sup>3</sup>H]prazosina 20 nM durante 1 h antes de la exposición térmica durante 30 min a temperaturas crecientes o bien (c) se trataron con [<sup>3</sup>H]prazosina 20 nM tras el calentamiento en ausencia de ligando. No pudo medirse ninguna señal significativa a partir de perlas recubiertas con ADRA1A o A1A-05 cuando se solubilizaron los receptores en ausencia de ligando. Se tomaron medidas paralelas para cada receptor en presencia de prazosina sin marcar 10  $\mu$ M como agente de competencia para determinar la señal de fluorescencia específica. Los puntos de datos se representan gráficamente como la media de medidas por duplicado, el 100% representa la señal medida tras calentar a 20°C durante 30 min. Las barras de error indican el error estándar de la media.

25 La figura 9 muestra las secuencias de aminoácidos de miembros de la biblioteca ADRA1A seleccionados estables. Las secuencias de aminoácidos de los receptores seleccionados se alinearon con ADRA1A original y el mutante de alta expresión anteriormente identificado A1A-05. Las ubicaciones de las hélices transmembrana se indican con cilindros mientras que el número de mutaciones con respecto a ADRA1A se muestra en la columna  $\Delta$ .

### Ejemplos

30 Selección de receptores acoplados a proteína G estables frente a detergente

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son proteínas integrales de membrana de interés terapéutico considerable. La familia de genes de GPCR es la mayor en el genoma humano y codifica para aproximadamente 850 receptores diferentes que detectan y responden a una enorme variedad de estímulos. Para la mayoría de los estudios biofísicos y estructurales, en primer lugar se necesita solubilizar los receptores en detergentes y purificarse. Aunque se han resuelto las estructuras cristalinas de varios GPCR, con frecuencia como fusión con lisozima de T4, lo cual excluiría el acoplamiento con G proteínas, muchos miembros de esta familia son demasiado inestables para tales estudios.

40 El desafío para un estudio más amplio de esta familia es que no se ha descrito ningún enfoque, ya sea racional o evolutivo, que permita una mejora directa de la estabilidad frente a detergente de proteínas integrales de membrana. Anteriormente se han identificado mutaciones estabilizantes usando enfoques de examen y barrido con alanina o de ensayo y error semirracionales. Sin embargo, incluso con plataformas automatizadas, sólo pueden examinarse pequeños números de mutantes, ya que el análisis debe realizarse con lisados preparados de manera individual. Alternativamente, se ha desarrollado un método de evolución dirigida que selecciona una expresión funcional superior en bacterias (Sarkar *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2008. 105(39): págs. 14808-13; Dodevski y Pluckthun, J Mol Biol, 2011. 408(4): págs. 599-615). Aunque una expresión funcional superior en la membrana mostró una clara correlación con la estabilidad en detergentes suaves, la resistencia frente a detergentes de cadena corta puede no correlacionarse directamente, ya que residuos particulares controlan el acceso de detergentes de cadena corta al interior de la proteína, al que no pueden acceder detergentes voluminosos o moléculas de fosfolípidos.

50 No obstante, para aprovechar los enormes poderes de la evolución dirigida iterativa, se buscó llevar a cabo la solubilización de receptor directamente en una célula bacteriana para permitir el examen simultáneo de  $>10^8$  células, que expresaban cada una diferentes mutantes de receptor, para determinar variantes de GPCR que son solubles en detergente y funcionales. Usando la célula como compartimento primario, se buscó mantener la conexión del fenotipo de GPCR con el genotipo (el plásmido codificante) y, por tanto, usar este examen como parte de un procedimiento darwiniano, es decir, una iteración de selección y diversificación.

El problema que debía resolverse era que la célula se disgregaba inmediatamente al exponerse a detergente, homogeneizando así toda la mezcla de mutantes de receptor y plásmidos, haciendo que el procedimiento fuera inútil para la evolución dirigida porque se destruiría la vinculación crucial del genotipo con el fenotipo.

Para resolver este problema, el concepto clave era encapsular las células. Se consideró que la conversión de una célula (bacteriana) que expresaba GPCR en una nanocápsula resistente a detergente, que contenía proteínas mutantes de GPCR solubilizadas y el plásmido codificante, permitiría el uso de diversas bibliotecas para la evolución molecular de GPCR resistentes a detergente adecuados para la cristalización de proteína. Se adaptó la selección funcional a partir de la selección de GPCR para detectar la alta expresión funcional en *E. coli* (Sarkar *et al.*, citado anteriormente; Dodevski y Pluckthun, citado anteriormente). Se aplicó un ligando de receptor marcado con fluorescencia a las células, que se unió a moléculas de receptor activo. Entonces pudieron seleccionarse células bacterianas que expresaban altas cantidades de GPCR activo en la membrana interior, cuya membrana exterior se permeabiliza suavemente, usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) a lo largo de múltiples rondas de expresión y selección. Entonces pudo identificarse la identidad genética de los mutantes de alta expresión mediante secuenciación de los plásmidos contenidos en las células seleccionadas. En el presente estudio, se necesita clasificar los receptores solubilizados, sin embargo, también podría usarse una estrategia de FACS similar con las células encapsuladas. La estrategia diseñada se denominó encapsulamiento, solubilización y examen celular de alto rendimiento (CHES) (figura 1).

Para encapsular las células, se optimizó una tecnología basada en la deposición capa a capa (LbL) de polielectrolitos (Hillberg y Tabrizian, *Biomacromolecules*, 2006. 7(10): págs. 2742-50). Este método no produjo ninguna cápsula vacía, pocas cápsulas que contenían múltiples células y pudo ampliarse a escala fácilmente para encapsular grandes números de células por lote ( $>10^{10}$ ). El método utilizó la carga de superficie negativa de las células de *E. coli* proporcionada por el lipopolisacárido presentado en la membrana exterior, que ayuda en la deposición de un polímero cargado positivamente, quitosano (poli-D-glucosamina), sobre la célula. Tras eliminar mediante lavado el quitosano no unido, se depositó polímero de alginato cargado negativamente, dando como resultado un fuerte recubrimiento de polímeros estables con cargas alternantes (figura 2a). Se optimizaron las condiciones de encapsulamiento examinando diferentes tampones y valores de pH para maximizar la deposición de polímero al tiempo que se minimizaba la agregación celular (figuras 2b y 2c). Las condiciones optimizadas produjeron preparaciones que consistían en cápsulas principalmente de tamaño de una única célula (figuras 3a y 3b), resistentes a detergente (figura 3c) cuando se analizaron con citometría de flujo y microscopía electrónica (figura 4). El encapsulamiento permitió el tratamiento con detergente de las células completas, cuya membrana celular se disgregó, mientras que GPCR expresado en la membrana interior se solubilizó *in situ* y se retuvo dentro de la cápsula, incluso tras la exposición a detergente durante 15 días (figura 3d).

A continuación se garantizó que las moléculas de GPCR solubilizadas con detergente, funcionales, podían detectarse dentro de las cápsulas y que los GPCR estables podían distinguirse de las variantes de GPCR no estables. Para estos experimentos, se usaron dos mutantes del receptor de neurotensina de rata (rNTS1). D03 es una variante de alta expresión de rNTS1 que se identificó usando evolución dirigida con presentación bacteriana y es estable en detergente suave. C7E02 es una variante derivada de D03 que es muy estable en micelas de DM. Se sometió a prueba la funcionalidad mediante FACS: ligando de NTR1 marcado con fluorescencia, NT marcado con HiLyte Fluor 647 (HL-NT), podía difundirse a través de los poros de cápsula y unirse al receptor solubilizado. Usando una mezcla de detergente suave (DDM al 1%, CHAPS al 0,5%, CHS al 0,1% y glicerol al 30%), pudo medirse la unión a ligando funcional de ambos receptores solubilizados mediante FACS de las cápsulas a lo largo de un periodo de 15 días (figura 3e). Cuando se trataron con un tampón de detergente más duro que contenía DM al 1,7%, las cápsulas que contenían D03 mostraron una pérdida de unión a HL-NT dentro del plazo de 10 h, mientras que el receptor estable C7E02 mostró actividad de unión a ligando a lo largo de todo el periodo de 15 días (figura 3e). De manera interesante, las señales de fluorescencia específicas medidas a partir de cápsulas que contenían receptores estables aumentaron a lo largo del tiempo, probablemente debido al aclaramiento de la cápsula mediante los detergentes, dando como resultado menos dispersión de la emisión de fluorescencia. En conjunto, estos experimentos demostraron claramente que podía analizarse con sonda las características de estabilidad de diferentes receptores que se habían solubilizado con detergente directamente dentro de las nanocápsulas.

Para verificar CHES como herramienta de selección en experimentos de evolución dirigida, se aplicó el método a una biblioteca anteriormente establecida que se sabía que contenía algunos receptores estables frente a detergente. La "biblioteca 303" es una colección de mutantes de rNTS1 derivados de D03. Se identificaron 30 posiciones variables en esta biblioteca a partir de una estrategia de mutagénesis por saturación y selección de alta expresión funcional. Se incluyeron 3 sustituciones de aminoácido adicionales en esta biblioteca que se había notificado que aumentaban la estabilidad de rNTS1. Se recombinaron estas 33 posiciones variables con residuos de tipo natural para producir una biblioteca con una diversidad teórica de  $8,6 \times 10^9$  mutantes individuales. Se aplicó previamente esta biblioteca a la presentación bacteriana para identificar mutantes de alta expresión (véase Schlinkmann *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2012, 422(3), 414-28). Se descubrió que varios de estos mutantes, incluyendo C7E02, eran relativamente estables en detergentes de cadena corta. Por tanto, esta biblioteca podía servir como caso de prueba para la selección mediante CHES, con el objetivo del aislamiento directo de receptores estables en detergentes de cadena corta examinando la diversidad de la biblioteca completa.

Se indujeron aproximadamente  $10^8$  transformantes de DH5 $\alpha$  de *E. coli* que contenían miembros de la biblioteca de GPCR y se dejó que expresaran el GPCR, se encapsularon y se trataron con DM al 2% durante 3 h a 20°C sin ligando, seguido por 2 h a 20°C en presencia de FL-NT 20 nM. En cada ronda, se seleccionó el mejor 0,5 - 1% de cápsulas con fluorescencia verde con FACS, seguido por rotura por ultrasonidos de las cápsulas, amplificación por PCR, nueva clonación y transformación de los mutantes seleccionados. En las rondas segunda y tercera, se usó el detergente de cadena corta octil-glucósido (OG) para la solubilización. La intensidad de fluorescencia de las poblaciones clasificadas a partir de las rondas 1 a 3 indicó un fuerte enriquecimiento de variantes de rNTS1 resistentes a OG en las poblaciones clasificadas (figura 5a).

Se clonaron los mutantes seleccionados después de la tercera ronda de clasificación en un vector de expresión que contenía una fusión de sfGFP C-terminal y una etiqueta Avi-tag para determinar la biotilación *in vivo* [21]. Para someter a prueba su estabilidad (figura 6), se solubilizaron proteínas de receptor expresadas en DM al 2% durante 3 h a 20°C y se inmovilizaron sobre perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, lo que permitió eliminar mediante lavado otras proteínas, y se intercambió el detergente por OG al 2%. Se añadió HL-NT para unirse a moléculas de receptor funcional.

De los 22 miembros de la biblioteca seleccionados sometidos a ensayo, 20 mostraron unión a ligando significativa cuando se solubilizaron en OG al 2% durante 2 h, mientras que el gen original, D03, era completamente inactivo (figura 5b). 13 clones mostraron fracciones significativamente aumentadas de receptores funcionales con respecto a C7E02 tras 2 h en OG al 2%. Después de más de 4 días en OG al 2%, 8 de esos clones todavía presentaban unión a ligando significativa, mientras que C7E02 era completamente inactivo. Resultaba alentador que la aplicación de CHES a la "biblioteca 303" generó una frecuencia tan alta de GPCR resistentes a OG.

Se midieron los perfiles de desnaturalización térmica de los 3 mejores clones seleccionados en presencia o ausencia de ligando, cuando se solubilizaron en DM al 1,7% u OG al 2%. 303OGB5, 303OGG7 y 303OGG8 mostraron estabilidad térmica potenciada con respecto a C7E02 cuando se calentaron en presencia o ausencia de NT tanto en DM como en OG (figura 5c, d, e y f). Resultaba de interés particular la alta estabilidad de estos receptores cuando se calentaron en ausencia de ligando, indicando un alto grado de estabilidad de receptor inherente. En cambio, no pudo medirse ninguna actividad para C7E02 en las mismas condiciones, probablemente porque C7E02 no era estable en OG sin NT unido, y para estos ensayos el detergente se había intercambiado en ausencia de ligando.

Por otro lado, los clones seleccionados mediante CHES, 303OGB5, 303OGG7 y 303OGG8, mostraron valores de  $T_{1/2}$  de aproximadamente 40°C en OG en presencia o ausencia de ligando (figuras 5e y f). Las secuencias de los receptores (figura 7) muestran 22, 21 y 14 sustituciones de aminoácido con respecto a D03, respectivamente, ubicadas principalmente dentro de las hélices transmembrana.

Para investigar si CHES podía aplicarse de manera genérica a GPCR, se aplicó la selección a una biblioteca del receptor adrenérgico alfa-1A (ADRA1A), que se había sometido anteriormente a dos rondas de PCR propensa a error y selección para determinar la alta expresión funcional en *E. coli* (Dodevski y Pluckthun, citado anteriormente). Se solubilizó la biblioteca de ADRA1A encapsulado *in situ* mediante una mezcla de detergente (DDM al 1%, CHAPS al 0,5%, CHS al 0,1%, glicerol al 30%) en presencia de prazosina marcada con BODIPY-FL (FL-prazosina) antes de la selección mediante FACS. Tras 3 rondas secuenciales de selección usando la misma mezcla de detergente, se sometieron a ensayo individualmente 21 clones individuales seleccionados para determinar la estabilidad aumentada en esta mezcla de detergente (figura 8a). 12 de estos receptores mostraron una estabilidad significativamente superior a la de ADRA1A de tipo natural y superior a la del mejor mutante anteriormente seleccionado para alta expresión funcional (A1A-05).

Se midieron perfiles de desnaturalización térmica de los 4 mejores clones seleccionados en presencia o ausencia de ligando (figuras 8b y c). Los 4 mejores clones seleccionados, A1ADCCA3, A1ADCCG4, A1ADCCD7 y A1ADCCD8, mostraron valores de  $T_{1/2}$  de aproximadamente 40°C en presencia de ligando, o de aproximadamente 35°C en ausencia del mismo. En estas condiciones, ADRA1A de tipo natural y el mutante A1A-05, seleccionados para la alta expresión funcional, parecieron inestables en este detergente en ausencia de ligando, incluso a 20°C, ya que no se obtuvo ninguna señal de fluorescencia significativa. Se encontró que los receptores sometidos a evolución directa para la estabilidad en detergente contenían entre 12 y 14 sustituciones de aminoácido en comparación con el receptor de tipo natural (figura 9). La mayoría de las mutaciones estaban ubicadas dentro del núcleo transmembrana de 7 dominios del receptor, principalmente en las hélices 2, 3, 4 y 7, y también se encontró que había muchas sustituciones conservadas en la cola C-terminal del receptor. De manera interesante, todos los clones seleccionados contenían sustituciones que no se identificaron en mutantes de ADRA1A seleccionados a partir de la misma biblioteca para determinar la alta expresión funcional (Dodevski y Pluckthun, citado anteriormente), lo que sugiere que CHES permite el enriquecimiento de mutaciones de baja frecuencia que mejoran específicamente la estabilidad del receptor en detergente. Como con las selecciones de la biblioteca basada en NTS1, CHES podía proporcionar las isoformas de ADRA1A más estables frente a detergente notificadas hasta la fecha.

La aplicación satisfactoria de CHES a dos GPCR no relacionados indica que CHES es un método rápido, novedoso, para generar directamente GPCR estables frente a detergentes duros que son perfectamente adecuados

para análisis biofísicos y exámenes de cristalografía. Haciendo evolucionar receptores que no dependen de la fusión de lisozima de T4 en uno de los bucles se simplifica el estudio de complejos con proteínas G. CHESS puede permitir la selección directa de mutantes de receptor que favorece la unión de miméticos de proteína G tales como péptidos o incluso las propias proteínas G, lo cual puede potenciar la selección directa de receptores estabilizados en conformaciones activas.

Dado que la permeabilidad de las cápsulas puede afinarse añadiendo capas de polielectrolitos adicionales, CHESS puede aplicarse a proteínas de membrana distintas de GPCR o a proteínas solubles tales como enzimas. Aunque es un método para formar compartimentos microscópicos y, por tanto, es similar a este respecto a emulsiones de agua en aceite, proporciona acceso a pequeñas moléculas desde y hacia el volumen de la disolución, y cada compartimento se crea directamente a partir de una célula bacteriana. Una aplicación tal como la descrita, en la que se usa detergente, no puede llevarse a cabo con emulsiones de agua en aceite. Todos los ensayos que normalmente requerirían rotura de la célula, tales como pruebas de estabilidad y solubilización de proteínas de membrana, o ensayos enzimáticos con sustratos fluorogénicos impermeables para las células, ahora pueden llevarse a cabo directamente en estos compartimentos creados a partir de células bacterianas vivas.

CHESS es adecuado para estudios de estabilidad a largo plazo porque, una vez encapsuladas de manera apropiada, las cápsulas de CHESS son estables durante semanas. Al convertir directamente una célula bacteriana en una cápsula estable semipermeable, el número de muestras que pueden someterse simultáneamente a prueba, en comparación con lisados de células individuales, se aumenta probablemente en 5 ó 6 órdenes de magnitud. En el campo del estudio de proteínas de membrana, se espera que CHESS pueda llegar a ser parte de una solución genérica para las dificultades asociadas con la evolución directa de proteínas estables frente a detergentes duros, tales como los GPCR descritos en el presente documento, conduciendo a su vez a una comprensión más completa de estas proteínas terapéuticamente relevantes.

#### Materiales y métodos

##### *Plásmidos, bibliotecas de receptores y expresión bacteriana*

Se usó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* para todas las clonaciones y expresiones en este estudio. Se transformó con bibliotecas o plásmidos que codificaban para GPCR y las proteínas se expresaron tal como se describió anteriormente (Sarkar *et al.*, citado anteriormente: Dodevski y Pluckthun, citado anteriormente).

##### *Encapsulamiento de células*

Para el encapsulamiento LbL se siguió el protocolo descrito por Hillberg *et al.* (citado anteriormente) con las siguientes modificaciones; se recogieron las células tras la expresión de proteínas mediante centrifugación a 3800 rcf en una centrífuga de cubetas oscilantes y se lavaron 3 veces con PBS pH 7,4, EDTA 1 mM y cloranfenicol 25  $\mu$ g/ml (PBS-E). Se resuspendieron las células en PBS-E pH 6,0 que contenía quitosano de bajo peso molecular 0,25 mg/ml (Sigma Aldrich) y se mezclaron vigorosamente. Se recogieron las células mediante centrifugación a 1700 rcf en una centrífuga de cubetas oscilantes y se lavaron 3 veces con PBS-E pH 6,0 antes de resuspenderse en PBS-E pH 6,0 que contenía ácido algínico de baja viscosidad 0,25 mg/ml (Sigma Aldrich) y se sometieron a agitación vigorosa. Se lavaron las cápsulas 3 veces en PBS-E pH 6,0 y finalmente se resuspendieron en PBS-E pH 7,4. Se caracterizaron las propiedades particuladas y fluorescentes de muestras encapsuladas usando un citómetro Partec CyFlow Space con capacidad de recuento de partículas volumétrico. En ensayos de unión a ligando medidos con FACS se expusieron células bacterianas a NT(8-13) marcado con HiLyte Fluor 647 (HL-NT) 20 nM (sintetizado por Anaspec) durante al menos 2 h antes de centrifugarse y lavarse una vez antes del análisis mediante FACS.

##### *Microscopía electrónica de transmisión*

Se centrifugó un cultivo de *E. coli* sin tratar en tubos Eppendorf y se desechó el sobrenadante. Se aspiraron células del sedimento en tubos capilares de celulosa y se sumergieron inmediatamente en 1-hexadeceno para prevenir el secado. Se cortaron tubos de aproximadamente 4 mm de longitud usando un bisturí y se transfirieron al pocillo de 150  $\mu$ m de un portamuestras de aluminio de 6 mm. Se centrifugaron cultivos de *E. coli* tratados en puntas de pipeta de 200  $\mu$ l selladas. Se retiró el sobrenadante con papel de filtro, se cortó la punta sellada y se transfirió directamente con pipeta el sedimento a la cavidad de 100  $\mu$ m de un portamuestras de aluminio de 6 mm. Se intercalaron las muestras con un portamuestras de aluminio de 6 mm plano sumergido en 1-hexadeceno y se congelaron a alta presión con un congelador a alta presión EM HPM100 (Leica Microsystems, Viena, Austria). Se sometieron las muestras a sustitución en congelación con acetona anhidra que contenía OsO<sub>4</sub> al 2% en una unidad de sustitución en congelación AFS2 (Leica Microsystems). Se sometieron las muestras a sustitución durante 8 h a -90°C, 8 h a -60°C, 8 h a -30°C y 1 h a 0°C con gradientes de transición de temperatura periódicos de 30°C/h. Después se lavaron las muestras dos veces con acetona anhidra a 4°C y se incrustaron en Epon/Araldite. Se sometieron secciones a tinción posterior con acetato de uranilo y citrato de plomo y se obtuvieron imágenes en un microscopio electrónico de transmisión Phillips CM 12 (FEI, Eindhoven, Países Bajos) usando una cámara Gatan CCD (1k x 1k) y

software de adquisición de microfotografías digitales (Gatan GmbH, Múnich, Alemania).

#### *Selección de GPCR estables frente a detergente a partir de bibliotecas*

Se encapsularon cultivos de *E. coli* transformados con bibliotecas de GPCR y se trataron con PBS-E pH 7,4 que contenía inhibidores de proteasa completos (Roche), cloranfenicol 25 µg/ml y DM al 2% (PBS-E(DM)). Para selecciones con la "biblioteca 303", la ronda de selección inicial implicó exposición de la biblioteca sin tratar encapsulada con DM al 2% durante 3 h a 20°C con agitación vigorosa sin ligando, seguido por 2 h a 20°C en presencia de NT(8-13) marcado con BODIPY FL (FL-NT) 20 nM (Sarkar *et al.*; citado anteriormente). Se lavaron las cápsulas dos veces en disolución de PBS-E(DM) antes de la selección mediante FACS del mejor 0,5 - 1% de cápsulas fluorescentes en el canal de FITC. Se recuperó la información genética de las cápsulas clasificadas mediante amplificación por PCR usando cebadores específicos tras la rotura por ultrasonidos de las cápsulas en un baño de agua con ultrasonidos durante 5 minutos. En las rondas segunda y tercera de selección, se solubilizaron las cápsulas en PBS-E(DM) como en la primera ronda durante 3 h, seguido por adición de FL-NT 20 nM durante 1 h, antes de recoger las cápsulas mediante centrifugación y resuspenderlas en PBS-E que contenía OG al 2% (PBS-E(OG)) y FL-NT 20 nM. Se lavaron las cápsulas una vez en FLNT 20 nM en PBS-E(OG) para fomentar el intercambio de detergente eficaz antes de incubarse durante 2 h en OG al 2% con ligando. Se lavaron las cápsulas dos veces en PBS-E(OG) y se clasificó el mejor 0,5 - 1% de las cápsulas fluorescentes con FACS.

Para selecciones de la biblioteca ADRA1A, se emprendieron 3 rondas de selección con condiciones idénticas para cada ronda. Se solubilizaron las cápsulas con DDM al 1%, CHAPS al 0,5%, el 0,1% en PBS, EDTA 1 mM, glicerol al 30% a pH 7,4 que contenía BODIPY-FL-prazosina 200 nM (Invitrogen) (FL-prazosina). Se lavaron las cápsulas dos veces en DDM al 1%, CHAPS al 0,5%, CHS al 0,1% en PBS, EDTA 1 mM, glicerol al 30% a pH 7,4 y se clasificó el mejor 0,5 - 1% de las cápsulas fluorescentes con FACS.

#### *Examen de clones seleccionados para determinar la estabilidad frente a detergente*

Se clonaron fragmentos de PCR amplificados a partir de las rondas finales de selección en un vector que contenía una fusión de sfGFP-AviTag C-terminal. Anteriormente se ha mostrado que la expresión de GPCR con una etiqueta Avi-tag C-terminal produce un alto porcentaje de receptor biotinilado *in vivo* (Dodevski y Pluckthun, citado anteriormente). Se expresaron los receptores en placas de 24 pocillos profundos y se solubilizaron las células en PBS-E(DM) que contenía lisozima de pollo 50 mg/ml (Sigma Aldrich). Se sometieron las placas a 5 min de sonicación en un baño de agua con ultrasonidos antes de la incubación durante 3 h a 20°C con agitación vigorosa. Se retiró el residuo celular con centrifugación y se incubó el sobrenadante que contenía receptor solubilizado con perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Invitrogen) y en el caso de miembros de la "biblioteca 303", HL-NT 20 nM durante 1 h a 4°C. Se mezclaron las disoluciones y se manipularon las perlas en placas de 96 pocillos profundos con un procesador de partículas magnéticas kingfisher FLEX (Thermo scientific). Para miembros de la "biblioteca 303", se transfirieron perlas recubiertas con receptor a 2 disoluciones de intercambio de detergente posteriores de PBS-E(OG) que contenía HL-NT 20 nM. Tras una exposición de 2 h o 100 h a OG, se lavaron las perlas una vez en PBS-E(OG), antes de transferirse a microplacas de 96 pocillos negras, de fondo transparente (Greiner) en 100 µl de PBS-E(OG) por pocillo. Se midieron los niveles de fluorescencia de HL-NT y sfGFP en cada pocillo usando un lector de placas de fluorescencia de monocromador doble M1000 (Tecan), con excitación a 630 nm para HL-NT y a 488 nm para sfGFP. Se midió la señal de emisión de fluorescencia a 668 nm para HL-NT y a 512 nm para sfGFP.

Para el análisis de clones de ADRA1A individuales, la no disponibilidad de un ligando marcado con fluorescencia roja implicó que se necesitara usar prazosina marcada con <sup>3</sup>H (Invitrogen) para cuantificar la unión de ligando a receptor solubilizado. Se llevó a cabo la expresión y solubilización como anteriormente usando la mezcla de detergente más suave de PBS-E pH 7,4 que contenía DDM al 1%, CHAPS al 0,5%, CHS al 0,1% y glicerol al 30% (PBS-E(DCC)) complementada adicionalmente con lisozima de pollo 50 mg/ml y [<sup>3</sup>H]prazosina 20 nM a 20°C. Tras la unión a perlas magnéticas y el lavado, volvieron a suspenderse ¾ de la disolución de perlas final por punto de datos (15 µl) en 200 µl de cóctel OptiPhase Supermix (PerkinElmer) y se midieron los recuentos de <sup>3</sup>H con un contador de centelleo de líquidos (1450 Microbeta plus; PerkinElmer). El ¼ restante de la disolución de perlas volvió a suspenderse en 100 µl de PBS-E(DCC) y se midió la fluorescencia de sfGFP de cada muestra tal como anteriormente.

#### *Ensayos de termoestabilidad*

Se expresaron receptores relacionados con NTS1 en cultivos de 200 ml durante 20-24 h a 20°C. Se recogieron las células con centrifugación, se lavaron una vez con PBS-E y se rompieron las células con sonicación (Sonifier 250, Branson). Se recogieron las células sometidas a lisis con centrifugación y se desechó el sobrenadante. Se solubilizó el sedimento en PBS-E(DM) que contenía lisozima de pollo 50 mg/ml a 20°C con agitación vigorosa durante 3 h. Se retiró el material insoluble mediante centrifugación y se expuso el sobrenadante a perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Se dejó unirse receptor solubilizado a las perlas durante 1 h a 4°C antes de transferirse a nuevos

- recipientes que contenían o bien PBS-E(DM) o bien PBS-E(OG) sin ligando y se mezclaron durante 15 min. Volvieron a suspenderse las perlas en nuevos recipientes que contenían o bien PBS-E(DM) o bien PBS-E(OG), con o sin ligando (o agente de competencia). Se distribuyeron disoluciones que contenían perlas a lo largo de filas de placa de PCR de 96 pocillos y se sometieron a 30 min de tratamiento térmico usando un ciclador de PCR en gradiente (Biometra). Se incubaron ligandos con perlas recubiertas con receptor durante 1,5 h antes o después del calentamiento. Se lavaron las perlas una vez en la disolución de detergente relevante antes de volver a suspenderse en microplacas de 96 pocillos negras, de fondo transparente, y medirse las intensidades de fluorescencia residual de cada pocillo como anteriormente. Se definieron los valores de  $T_{1/2}$  aparente usando ajuste de regresión no lineal de los datos con GraphPad Prism.
- 5
- 10 Para clones derivados de ADRA1A, se realizó la expresión y sonicación como anteriormente, pero se solubilizó el sedimento en PBS-E(DCC) que contenía lisozima de pollo 50 mg/ml a 20°C con agitación vigorosa durante 3 h en ausencia de ligando. Se realizó un tratamiento térmico y con ligando como anteriormente, realizándose el ensayo de unión a radioligando y el ajuste de la curva tal como se describió anteriormente (Dodevski y Pluckthun, citado anteriormente).

15

**REIVINDICACIONES**

1. Método para seleccionar un conjunto de secuencias de una biblioteca de secuencias de ácido nucleico expresadas, en el que
- 5 - se proporciona una pluralidad de células, comprendiendo cada célula una secuencia de ácido nucleico expresada, expresada como una proteína diana en dicha célula,
- se encapsula dicha pluralidad de células en una etapa de encapsulamiento, que comprende
- o tratar dicha pluralidad de células con un polisacárido catiónico en una etapa de tratamiento catiónico,
  - o tratar dicha pluralidad de células con un polisacárido aniónico en una etapa de tratamiento aniónico,
- dando lugar dicha etapa de encapsulamiento a una pluralidad de células encapsuladas,
- 10 - solubilizar la membrana de dichas células encapsuladas en una etapa de solubilización, dando lugar a una pluralidad de compartimentos solubilizados,
- poner en contacto dicha pluralidad de compartimentos solubilizados, en una etapa de marcaje, con
- o un ligando para dicha proteína diana, portando dicho ligando un marcador detectable, o con
  - o un indicador de una actividad enzimática de dicha proteína diana, convirtiendo dicha actividad enzimática
- 15 dicho indicador en un marcador detectable,
- seleccionar un subconjunto de dicha pluralidad de compartimentos solubilizados como función de marcador detectable presente en dichos compartimentos solubilizados en una etapa de selección, dando lugar a una selección, y
- aislar dichas secuencias de ácido nucleico expresadas de la selección como un conjunto de secuencias
- 20 seleccionado en una etapa de aislamiento.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el polisacárido catiónico es quitosano, y /o el polisacárido aniónico es alginato o ácido hialurónico.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de tratamiento catiónico precede a la etapa de tratamiento aniónico.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se repite una secuencia de etapas que comprende una etapa de tratamiento catiónico seguida por una etapa de tratamiento aniónico de dos a diez veces.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el marcador detectable es un colorante fluorescente.
- 30 6. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que dicho ligando es un oligopéptido, agonista, antagonista, sustrato o análogo de estado de transición que se une a una variante de dicha proteína diana.
7. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que el conjunto de secuencias seleccionado se transfiere a una pluralidad de células y se somete a una secuencia de etapa de encapsulamiento, etapa de solubilización, etapa de marcaje, etapa de selección y etapa de aislamiento.
- 35 8. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que tras dicha etapa de aislamiento, dicho conjunto de secuencias seleccionado se diversifica mediante
- a. amplificación de dichas secuencias de ácido nucleico expresadas mediante un procedimiento que introduce mutaciones en la secuencia amplificada, y/o mediante
  - b. delección o inserción de tramos de secuencia en dichas secuencias de ácido nucleico expresadas,
- y posteriormente, se somete el conjunto de secuencias seleccionado a otra secuencia de etapa de encapsulamiento,
- 40 etapa de solubilización, etapa de marcaje, etapa de selección y etapa de aislamiento.

9. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que dicha biblioteca de secuencias de ácido nucleico expresadas es una biblioteca de secuencias homólogas con una identidad de al menos el 60% entre sí.
10. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que dicha secuencia de ácido nucleico expresada está comprendida en un constructo de expresión de transgenes.
- 5 11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho constructo de expresión de transgenes es un plásmido.
12. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que dicha proteína diana es una proteína de receptor acoplada a proteína G, un canal de iones, una enzima, un receptor nuclear, un factor de transcripción o una proteína de unión a ADN/ARN.
- 10 13. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que dicha etapa de solubilización se logra exponiendo dichas células encapsuladas a un detergente.
14. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que dichas células son células bacterianas.
15. Método según cualquiera de las etapas anteriores, en el que dicho marcador detectable es un colorante fluorescente y dicha etapa de selección se logra mediante clasificación celular fluorescente.

Fig. 1

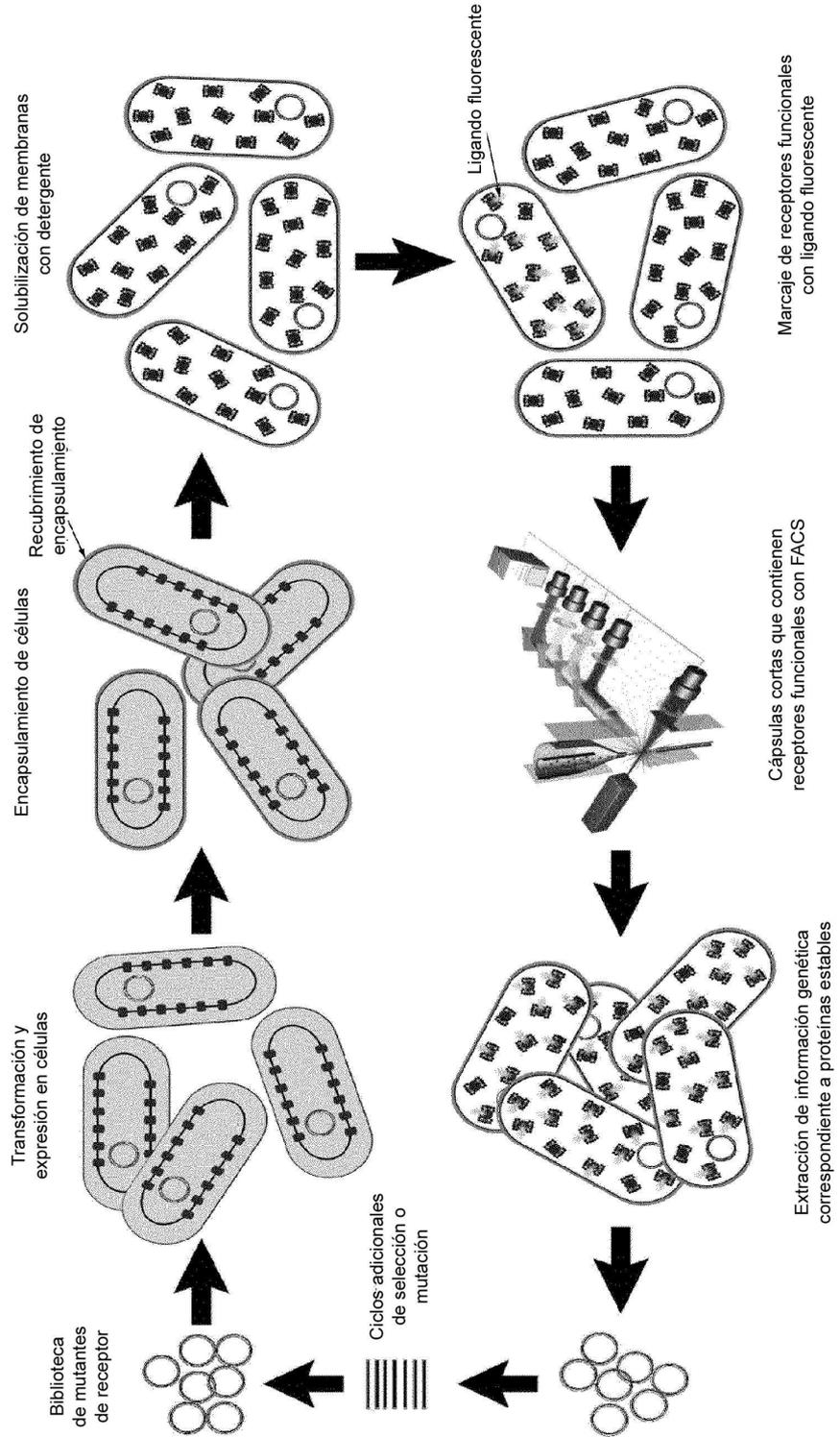


Fig. 2a

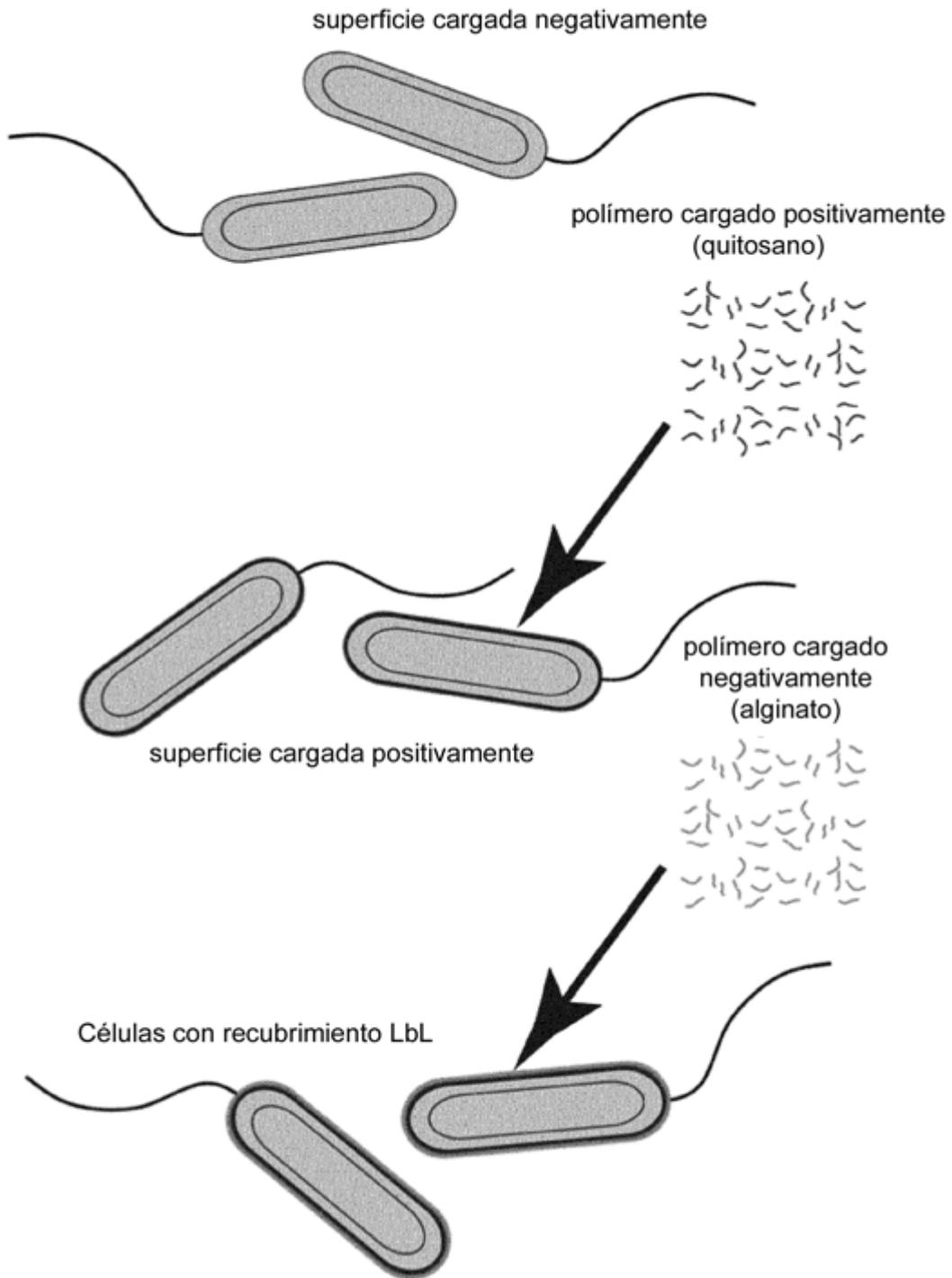
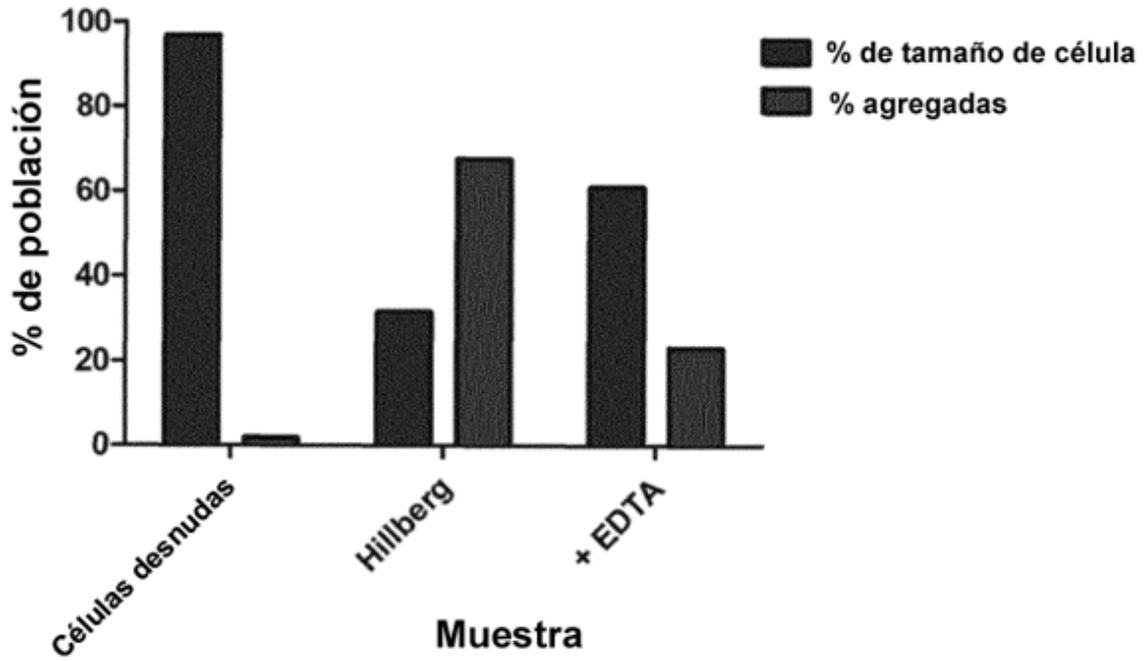
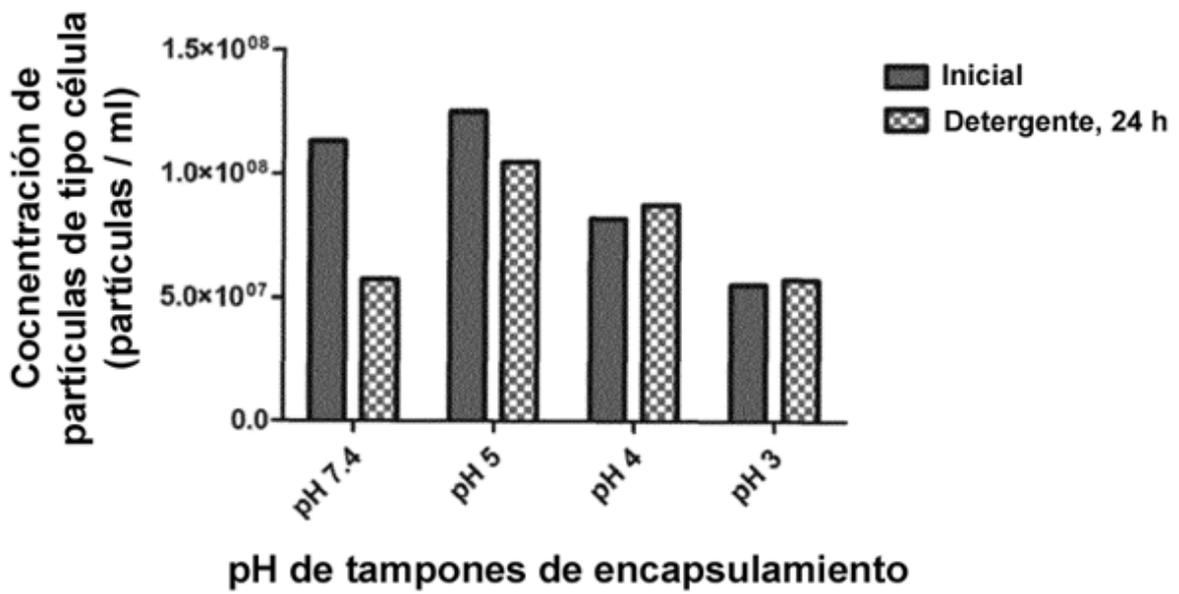


Fig. 2b/2c

b

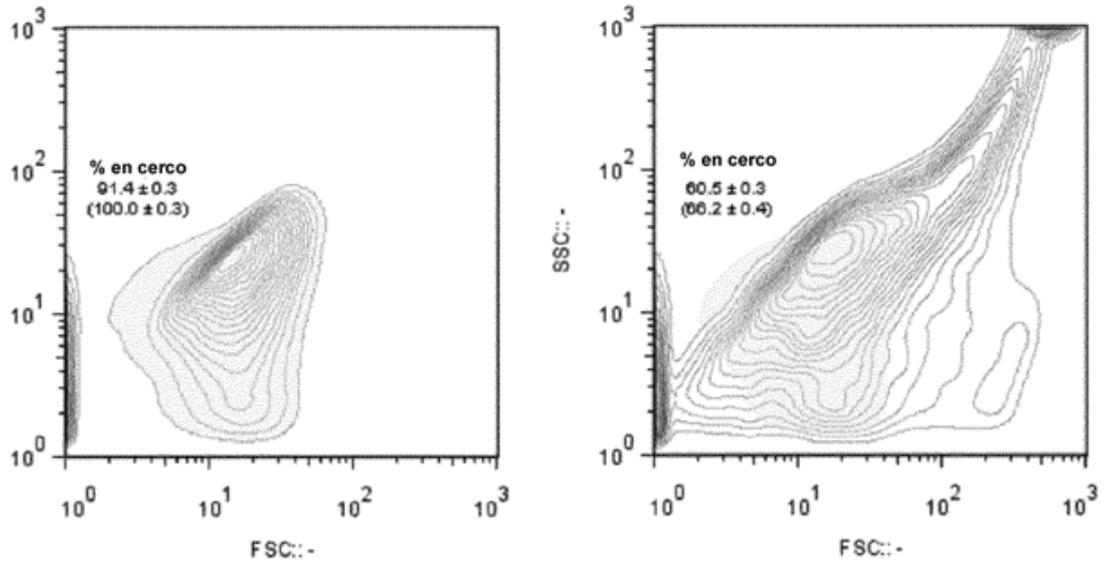


b



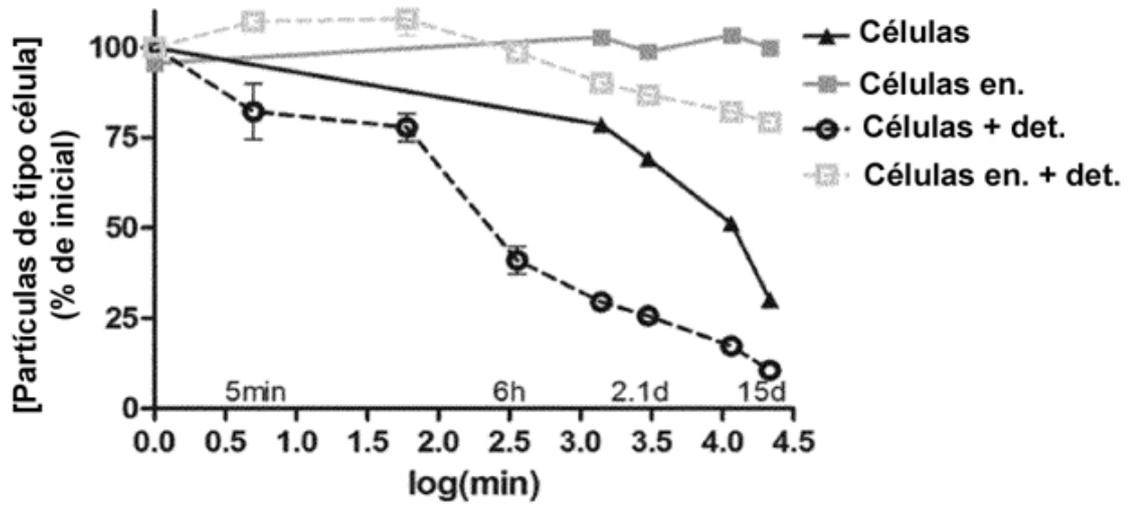
c

Fig. 3



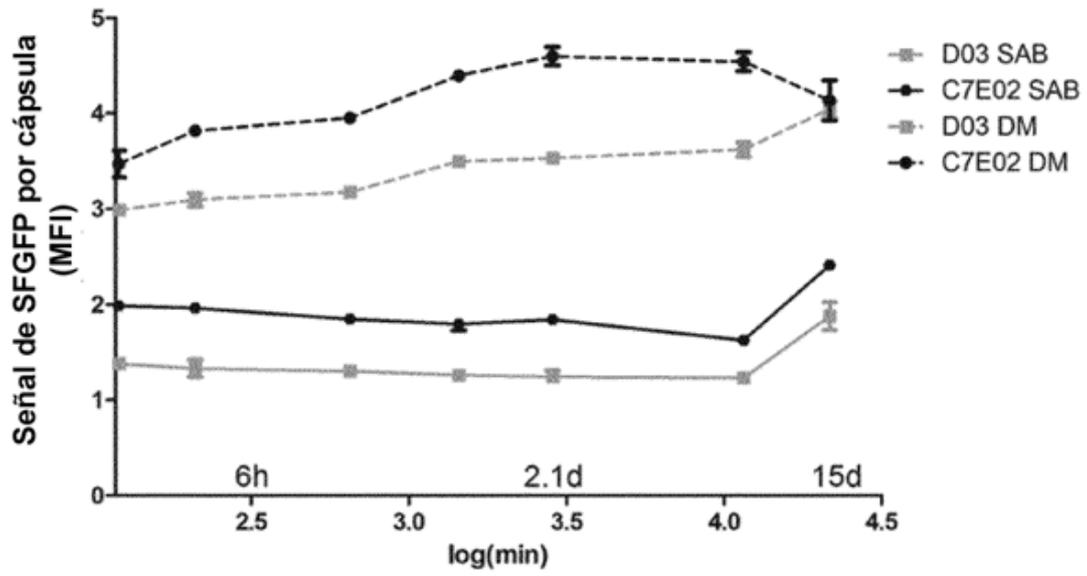
a

b

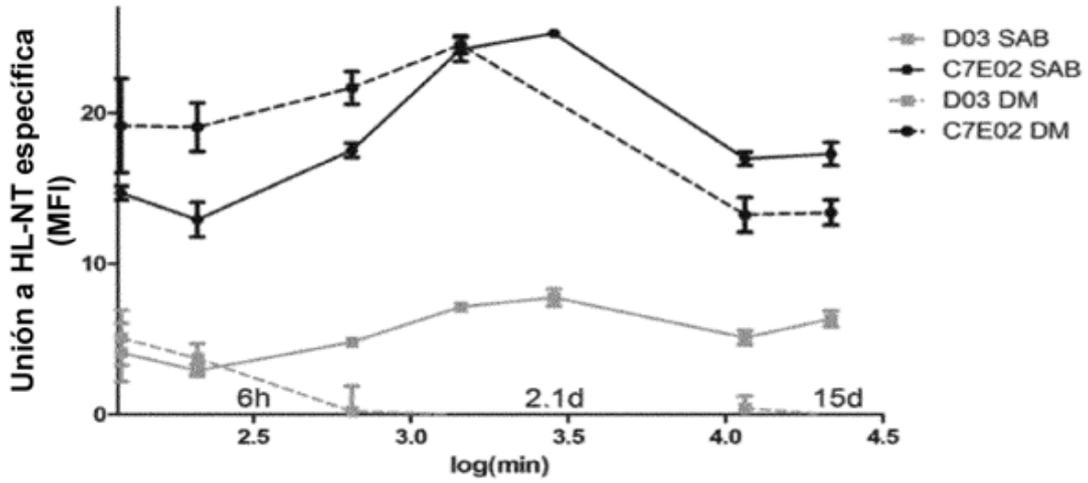


c

Fig. 3 d, e



d



e

Fig. 4

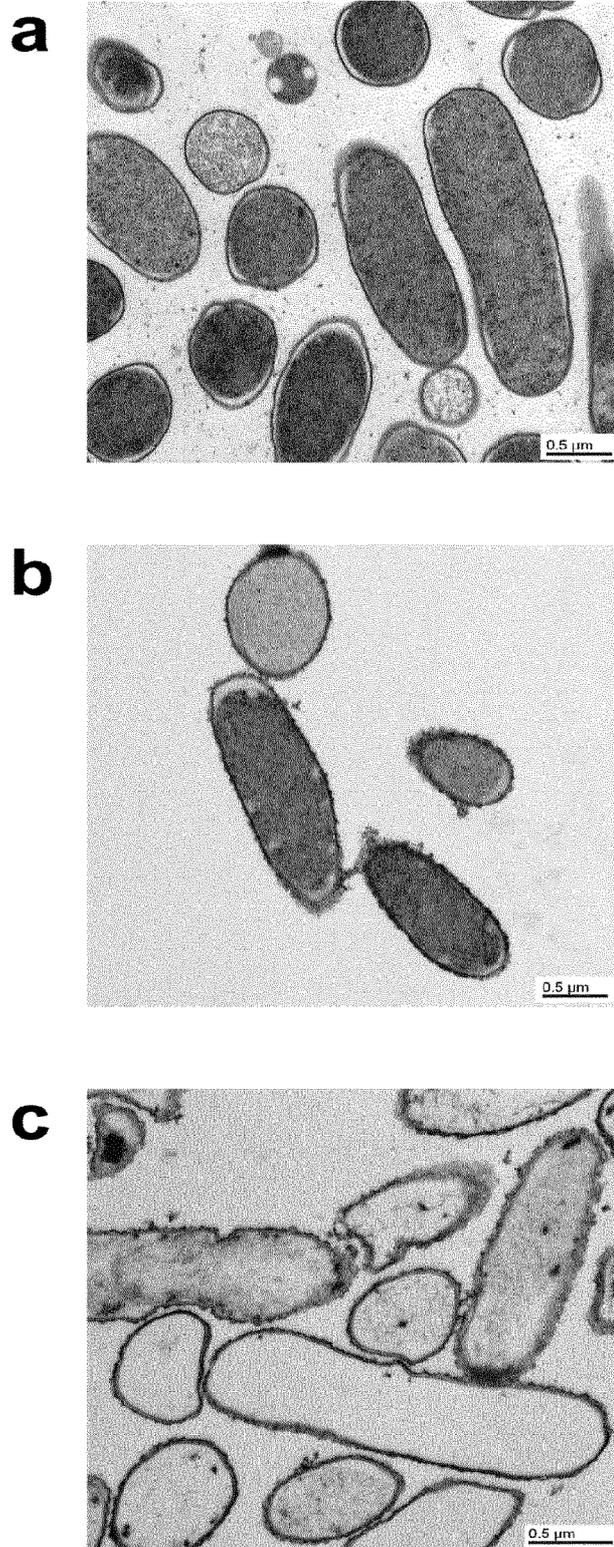
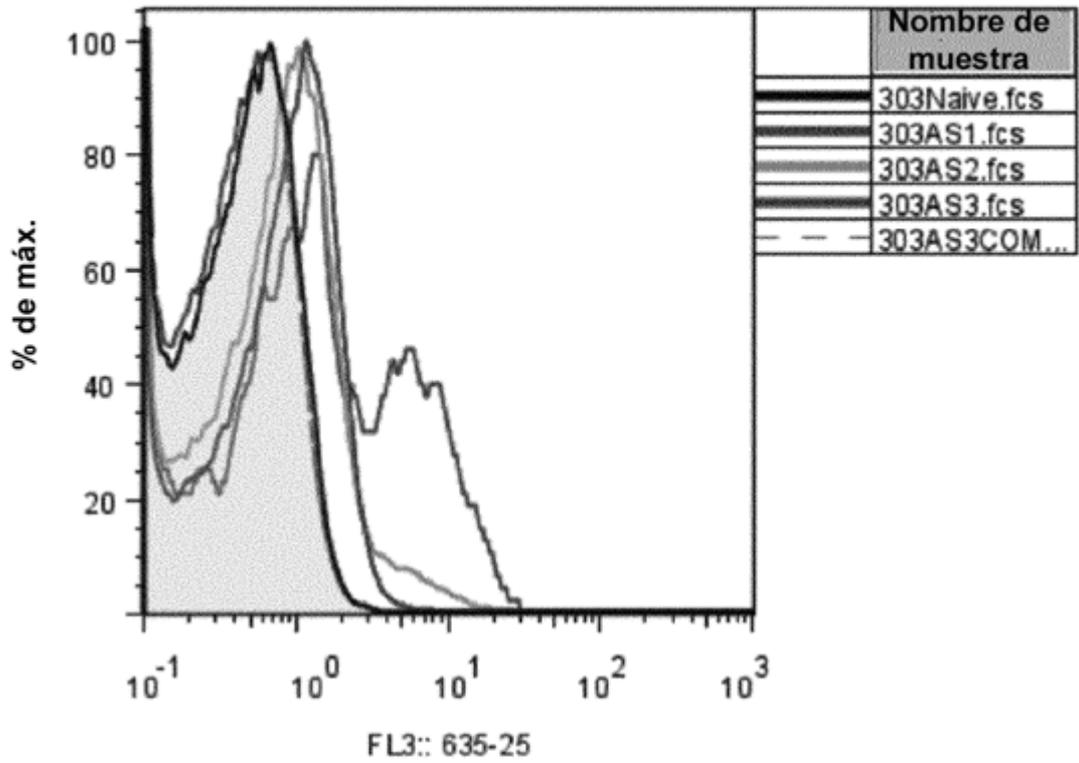
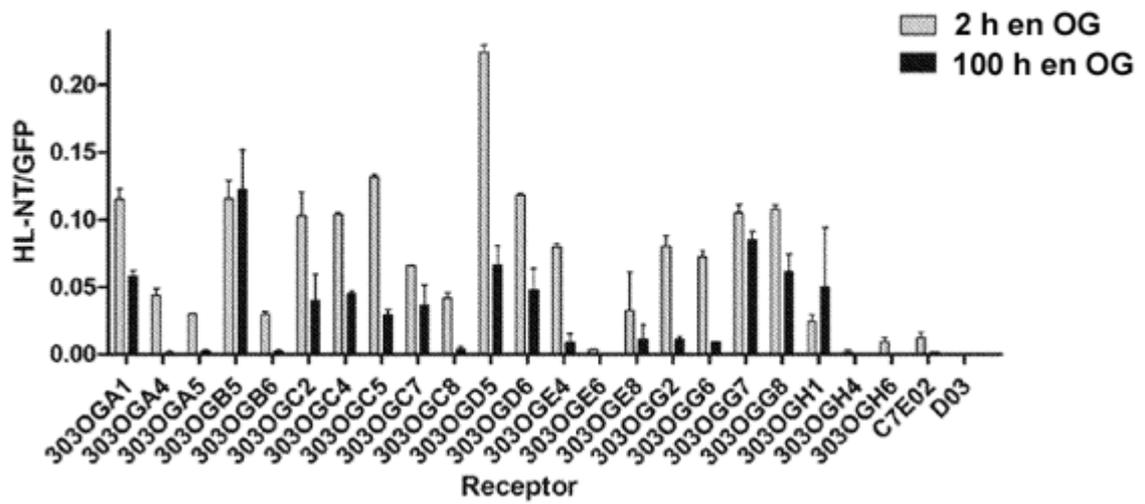


Fig. 5

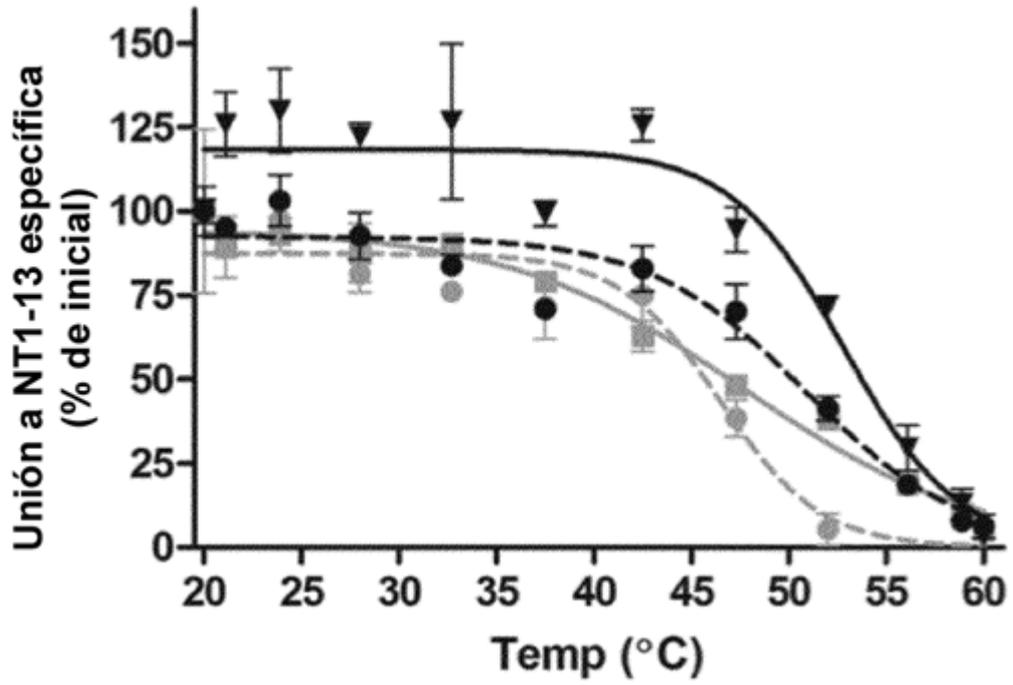


a

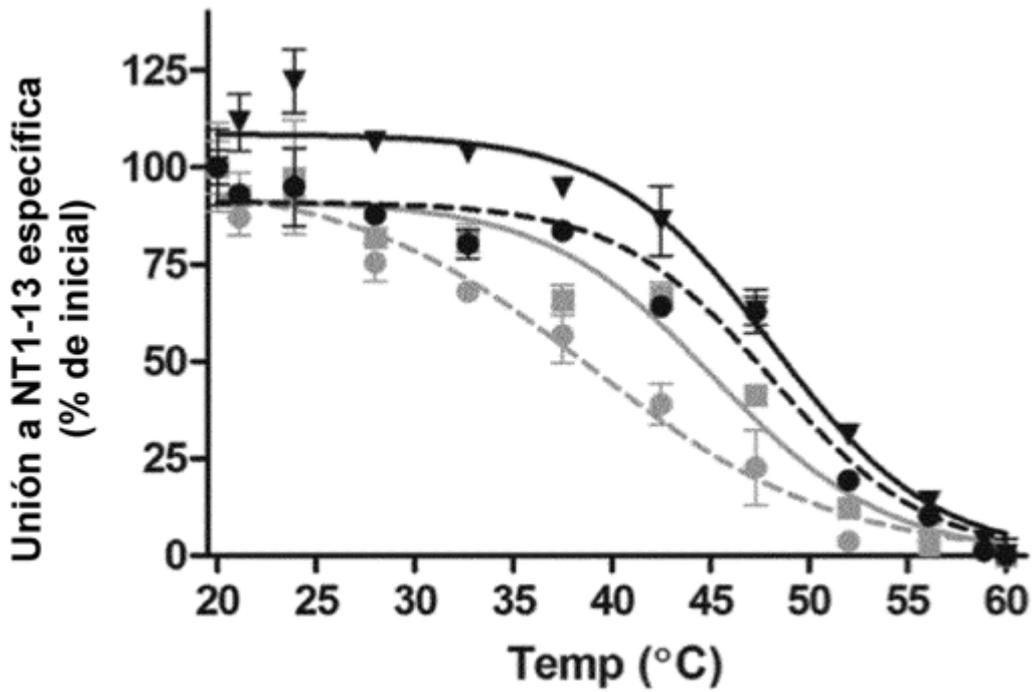


b

Fig. 5 c-d



c



d

Fig. 5 e-f

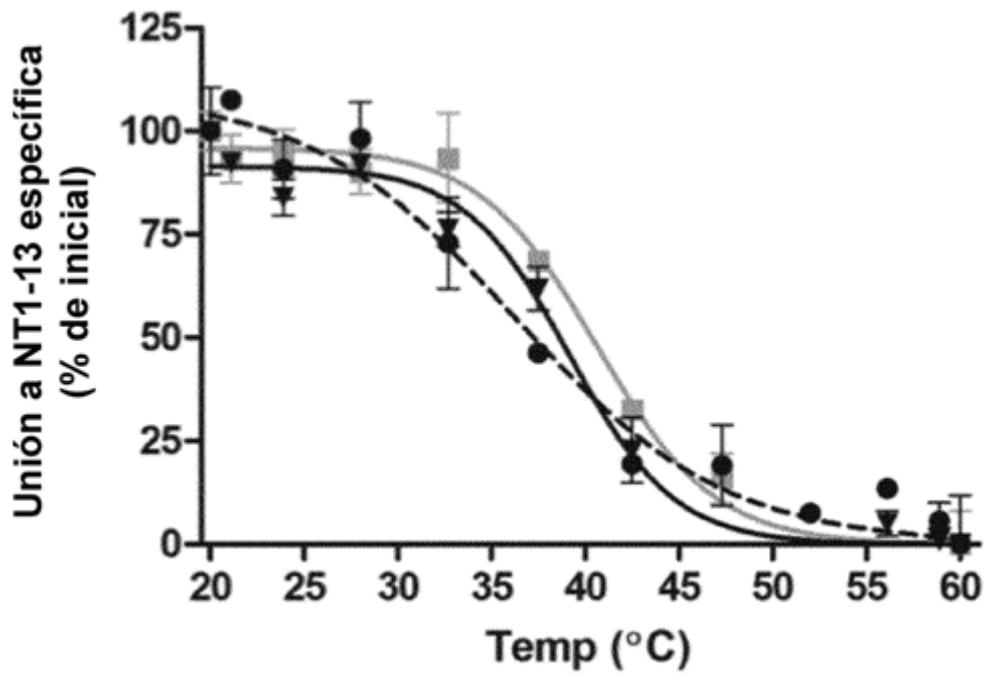
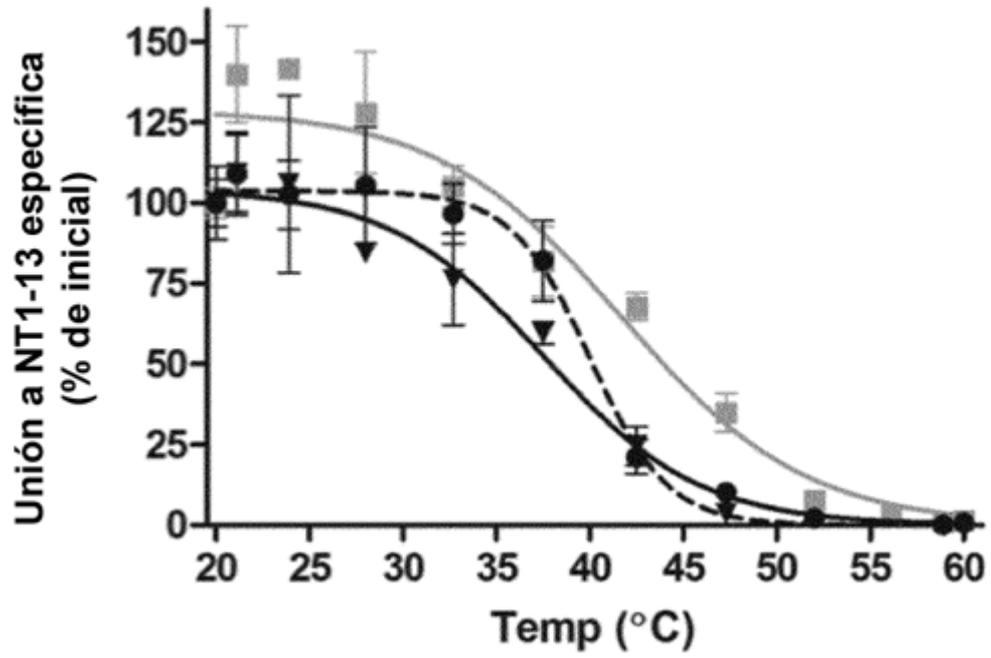


Fig. 6

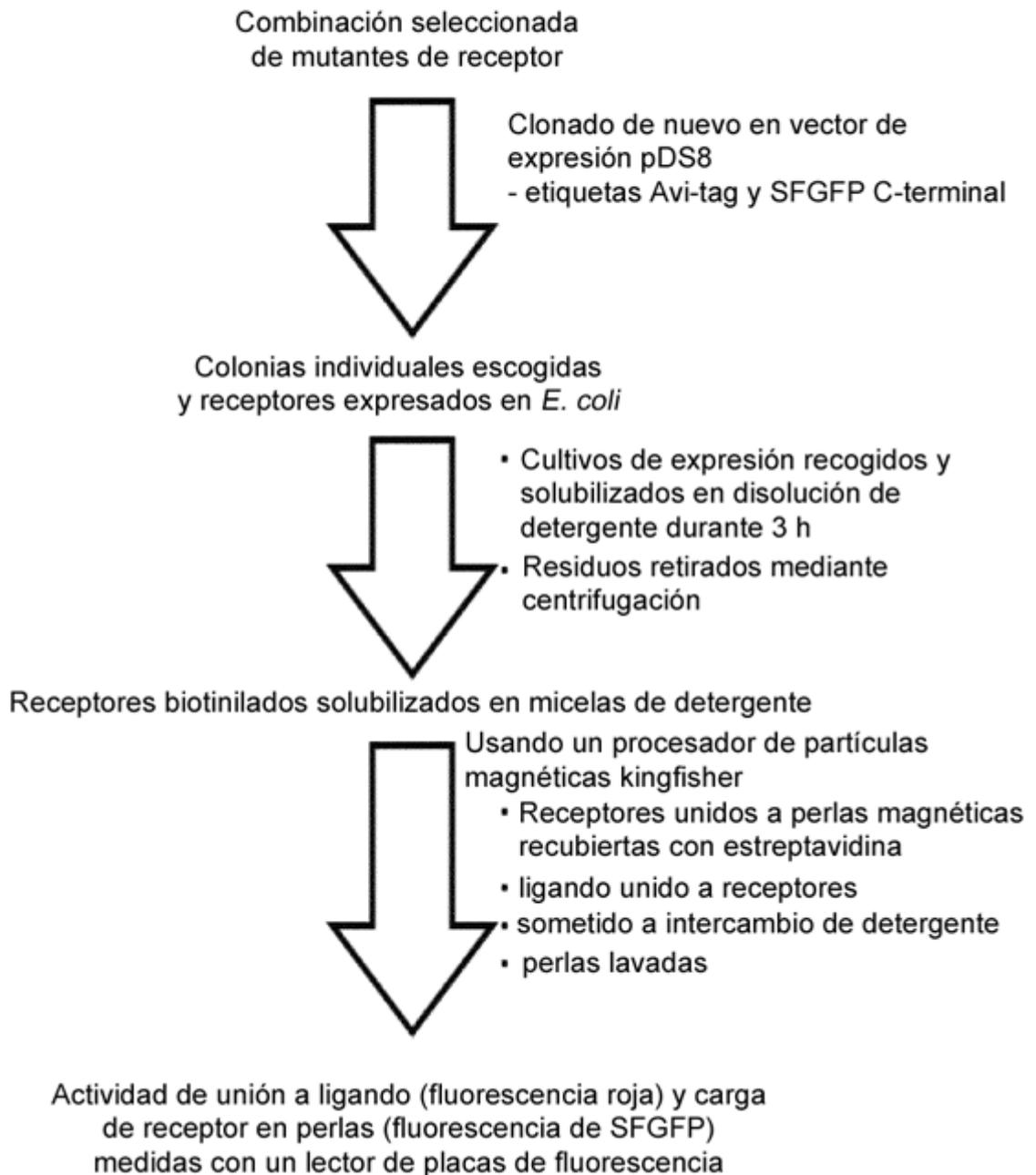


Fig. 7

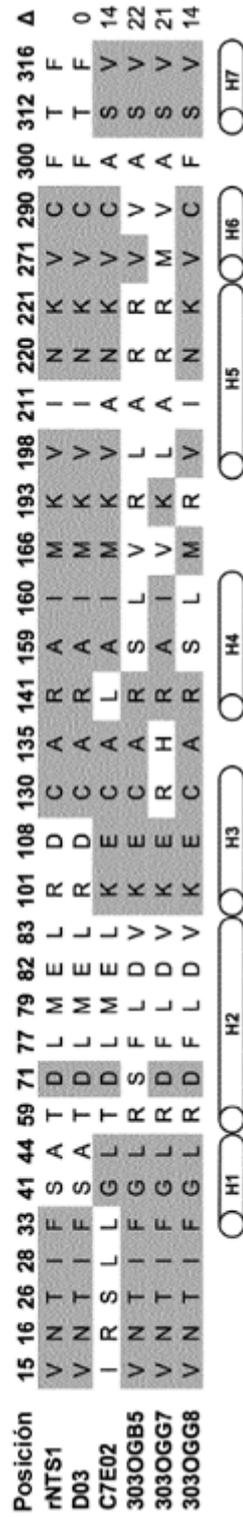
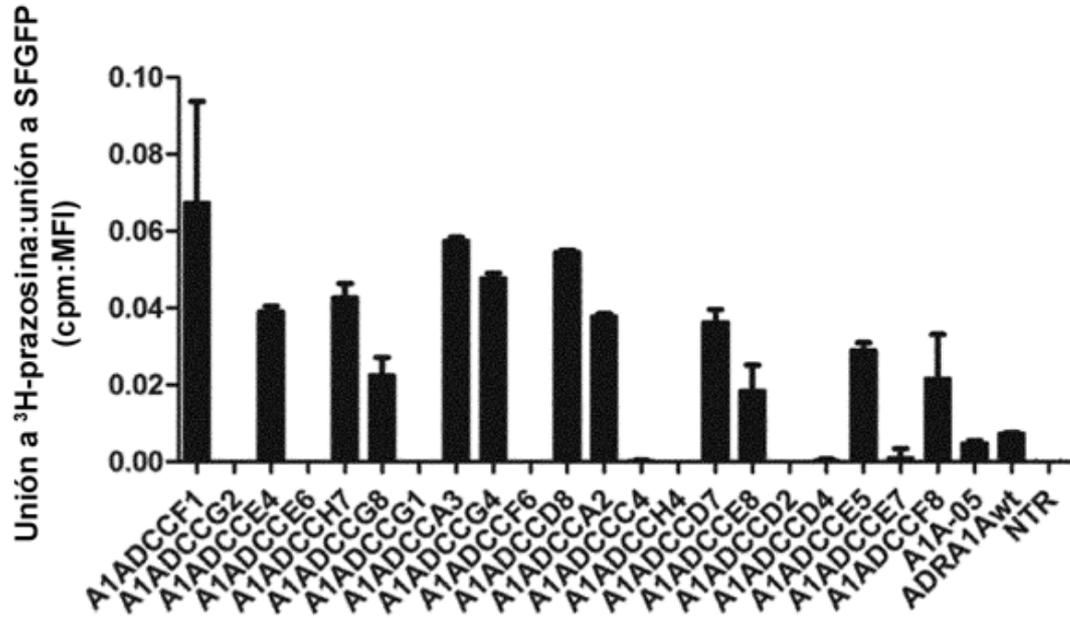
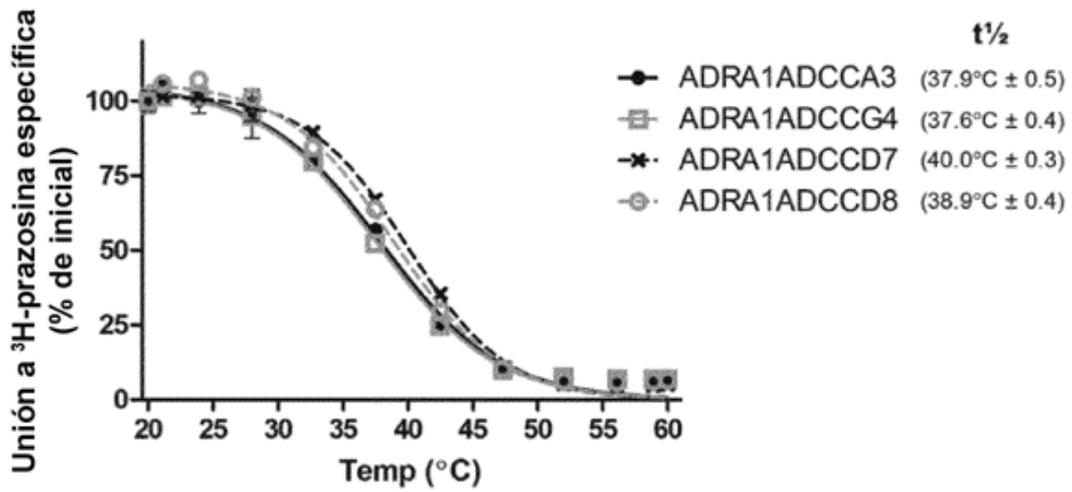


Fig. 8



a



b

Fig. 8 c

