(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 630 224**

(51) Int. CI.:

C12N 15/81 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2004 E 10183188 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2330201**

(54) Título: **Métodos para sintetizar polipéptidos heteromultiméricos en levadura con el uso de una estrategia de apareamiento haploide**

(30) Prioridad:

22.10.2003 US 513876 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2017

(73) Titular/es:

KECK GRADUATE INSTITUTE (50.0%)
535 Watson Drive
Claremont, CA 91711, US y
ALDER BIOPHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

CREGG, JAMES M.;
LATHAM, JOHN;
LITTON, MARK;
SCHATZMANN, RANDALL y
TOLSTORUKOV, IIYA I.

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para sintetizar polipéptidos heteromultiméricos en levadura con el uso de una estrategia de apareamiento haploide

Antecedentes de la invención

La producción de proteínas recombinantes es una actividad esencial para la selección de alto rendimiento, la validación funcional, la biología estructural, y la producción de polipéptidos farmacéuticos. Escherichia coli es un organismo ampliamente usado para la expresión de proteínas heterólogas debido a que crece fácilmente a una alta densidad celular en sustratos económicos, y tiene técnicas genéticas y vectores de expresión bien establecidos. Sin embargo, esto no siempre es suficiente para la producción efectiva de biomoléculas activas. Las cadenas polipeptídicas para ser biológicamente activas, tienen que plegarse en la estructura tridimensional nativa correcta, que incluye la formación apropiada de enlaces disulfuro, y pueden requerir adicionalmente la asociación correcta de múltiples cadenas.

Aunque el estado activo de la proteína puede favorecerse termodinámicamente, la escala de tiempo para el plegamiento puede variar desde milisegundos a días. Las barreras cinéticas se introducen, por ejemplo, por la necesidad para el alineamiento de subunidades y subdominios. Y particularmente con proteínas eucariotas, las reacciones covalentes deben tener lugar para que se forme la proteína correctamente plegada. Los últimos tipos de reacción incluyen la formación de enlaces disulfuro, la isomerización cis/trans de la cadena polipeptídica alrededor de los enlaces peptídicos de prolina, el procesamiento de preproteínas y la ligación de grupos prostéticos. Estas limitaciones cinéticas pueden resultar en la acumulación de intermediarios parcialmente plegados que contienen superficies hidrofóbicas 'pegajosas' expuestas, que promueven la autoasociación y formación de agregados.

Los anticuerpos son proteínas tetraméricas, que tienen muchos usos en el diagnóstico clínico y la terapia. Cada tetrámero de anticuerpo se compone de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Los anticuerpos humanos o humanizados puros de un tipo específico son difíciles o imposibles de purificar de fuentes naturales, en cantidades suficientes para muchos propósitos. Como consecuencia de ello, las empresas farmacéuticas y de biotecnología han recurrido a métodos basados en ADN recombinante para prepararlos a gran escala. La producción de anticuerpos funcionales requiere no sólo la síntesis de los dos polipéptidos, sino además un número de modificaciones postraduccionales, que incluyen el procesamiento proteolítico de la secuencia señal de secreción N-terminal; el plegamiento y ensamblaje adecuados de los polipéptidos en tetrámeros; la formación de enlaces disulfuro; y la glicosilación específica a enlace N. Todos estos eventos tienen lugar en la vía secretora de células eucariotas, un complejo de orgánulos único para las células eucariotas.

La síntesis recombinante de tales proteínas complejas ha tenido que depender de los sistemas basados en cultivos de tejidos de eucariotas superiores para el material biológicamente activo. Sin embargo, los sistemas de producción basados en el cultivo de tejidos de mamíferos son significativamente más caros y complicados que los métodos de fermentación microbiana. Adicionalmente, continúan cuestionándose los productos terapéuticos producidos con el uso de materiales derivados de subproductos animales.

Como eucariota, *Pichia pastoris* tiene muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de eucariotas superiores, tales como el procesamiento de proteínas, el plegamiento de proteínas, y la modificación postraduccional, a la misma vez que es tan fácil de manipular como E. coli o *Saccharomyces* cerevisiae. Es más rápido, más fácil y menos costoso de usar que otros sistemas de expresión eucariotas, tales como baculovirus o de cultivo de tejidos de mamíferos, y generalmente da mayores niveles de expresión. Como una levadura, comparte las ventajas de las manipulaciones moleculares y genéticas con *Saccharomyces*. Estas características hacen de *Pichia* muy útil como sistema de expresión de proteínas.

Muchas de las técnicas desarrolladas para *Saccharomyces* pueden aplicarse a *Pichia*. Estos incluyen la transformación por complementación; la interrupción génica y la sustitución génica. Adicionalmente, la nomenclatura genética usada para *Saccharomyces* se ha aplicado a *Pichia*. Existe, además, complementación cruzada entre productos génicos tanto en *Saccharomyces* como en *Pichia*. Varios genes silvestres de *Saccharomyces* complementan genes mutantes comparables en *Pichia*.

La expresión heteróloga en *Pichia pastoris* puede ser lo mismo intracelular como secretada. La secreción requiere la presencia de una secuencia señal en la proteína expresada para orientarla hacia la vía secretora. Aunque varias secuencias señal de secreción diferentes se han usado exitosamente, que incluyen la señal de secreción nativa presente en algunas proteínas heterólogas, el éxito ha sido variable. Una ventaja potencial de secreción de proteínas heterólogas es que *Pichia pastoris* secreta bajos niveles de proteínas nativas. Eso, combinado con la muy baja cantidad de proteína en el medio mínimo de crecimiento de *Pichia*, significa que la proteína heteróloga secretada comprende la gran mayoría de la proteína total en el medio y sirve como la primera etapa en la purificación de la proteína.

Muchas especies de levaduras, que incluye *Pichia*, se cruzan competente. Esto permite que dos cepas haploides distintas se apareen naturalmente y generen una especie diploide que poseen dos copias cromosómicas.

Aunque *P. pastoris* se ha usado exitosamente para la producción de varias proteínas heterólogas, por ejemplo, el antígeno de superficie de hepatitis B (Cregg y otros (1987) Bio/Technology 5:479), lisozima e invertasa (Digan y otros (1988) Dev. Indust. Micro. 29:59; Tschopp y otros (1987) Bio/Technology 5:1305), los esfuerzos para producir otros productos de genes heterólogos en *Pichia*, especialmente mediante secreción, han dado resultados mixtos. En el nivel actual de entendimiento del sistema de expresión de *P. pastoris*, es impredecible si un gen dado pueda expresarse a un nivel apreciable en esta levadura o si *Pichia* tolerará la presencia del producto génico recombinante en sus células. Además, es especialmente difícil prever si una proteína particular será secretada por *P. pastoris*, y si lo es, a qué eficiencia.

El documento núm. WO 00/23579 describe la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes mediante transformación de una sola cepa haploide de levadura de *P. pastoris* con genes de inmunoglobulinas de ratón/humano que codifican las cadenas pesadas y ligeras.

El documento núm. US-A-6,204,023 describe huéspedes de levadura transformados para la producción de moléculas o fragmentos de inmunoglobulinas quiméricas o derivados de estos.

La presente invención proporciona métodos mejorados para la secreción de heteromultímeros heterólogos a partir de levadura de apareamiento competente, que incluye la especie de *Pichia pastoris*.

Resumen de la invención:

Se proporcionan métodos para la síntesis y secreción de proteínas de inmunoglobinas heteromultiméricas recombinantes en la levadura *Pichia pastoris* competente. Las proteínas heteromultiméricas de interés comprenden al menos dos cadenas polipeptídicas no idénticas, por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, las cadenas alfa y beta del MHC; y similares. Se proporciona un vector de expresión para cada cadena de polipéptido no idéntica.

Cada vector de expresión se transforma en una célula de levadura haploide de *Pichia pastoris*. En algunas modalidades de la invención, la célula haploide de levadura está marcada genéticamente, donde la célula haploide de levadura es una de un par complementario. Un primer vector de expresión se transforma en una célula haploide y un segundo vector de expresión se transforma en una segunda célula haploide. Cuando las células haploides tienen que cruzarse, esto será a través de fusión genética directa, o se induce un evento similar con fusión de esferoplastos.

Los niveles de expresión de los polipéptidos no idénticos en las células haploides pueden calibrarse individualmente, y ajustarse a través de la selección apropiada, el número de copias del vector, la fuerza y/o la inducción del promotor y similares. En una modalidad de la invención, el promotor cada vector de expresión es diferente. En otra modalidad de la invención, se proporciona el mismo promotor para cada uno. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles.

Las células haploides transformadas, que cada una sintetiza individualmente un polipéptido no idéntico, se identifican y después se cruzan o fusionan genéticamente. Las cepas diploides resultantes se utilizan para producir y secretar proteínas de inmunoglobulinas heteromultiméricas, completamente ensambladas y biológicamente funcionales. La metodología diploide permite que el apareamiento de subunidades optimizadas mejoren la generación y secreción de productos de longitud completa.

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1D. Generación de anticuerpo recombinante de longitud completa ensamblado. La metodología de detección por inmunotransferencia se usó para caracterizar las cepas de *Pichia* haploides parentales, que cada una produce una subunidad del anticuerpo y para la cepa diploide objetivo que produce ambas subunidades que forman el anticuerpo totalmente ensamblado. Las cepas de levadura que se muestran en la Figura 1A muestran un cultivo estático de cada una de las cepas representativas, donde la parte superior es la de cepas haploides distintas que contienen subunidades de cadena pesadas (H) y ligera (L), respectivamente; la parte inferior, del diploide estable cruzado que produce ambas subunidades. La Figura 1B muestra la detección selectiva de la cadena H, que se encuentra sólo en el haploide de cadena H parental, y el diploide cruzado que contiene tanto H como L. La Figura 1C muestra la detección general de las cadenas H y L, que establece que la producción proteica es activa en las tres cepas. La Figura 1D muestra la detección selectiva en la cepa diploide del anticuerpo completo ensamblado correctamente, lo que confirma que sólo el sistema diploide es capaz de generar anticuerpos completamente ensamblados.

Figura 2. Producción de anticuerpos de longitud completa en Picchia pastoris. La expresión heteróloga de anticuerpos de longitud completa se llevó a cabo mediante el uso de una cepa diploide de *Pichia pastoris*. La proteína de anticuerpo exportado se aisló de medios acondicionados mediante el uso de la cromatografía de afinidad con proteína A. Se muestra una alícuota de la fracción máxima. El estándar de IgG humana se derivó de IgG humana purificada de reserva.

Figura 3. El anticuerpo ensamblado se detectó y se caracterizó a partir de los sobrenadantes de los medios de subclones de cepas diploides de *Pichia pastoris*, que se modificaron genéticamente para producir anticuerpos

quiméricos de ratón/humano de longitud completa. Las placas de microtitulación se recubrieron con anticuerpos anti-humanos selectivos para Fc para capturar el anticuerpo del medio de cultivo. Se detectó el anticuerpo ensamblado correctamente a través del uso de un (Fab')2 humano selectivo, que reconoce las regiones constantes de la cadena ligera κ y de la pesada CH1 apareadas. Se aplicaron diluciones en serie de medios clarificados a la placa. El desarrollo fue a través de métodos de visualización estándar de ELISA. La detección es selectiva, como se muestra por la falta de cualquier señal detectable en el patrón mIgG.

Figura 4. Manchas de anticuerpos anti-CD3 recombinantes generados de *Pichia* que contienen células T Jurkat, así como también, anticuerpos tradicionales derivados de mamíferos. Las células T Jurkat se inmovilizaron en portaobjetos de vidrio y la tinción se llevó a cabo mediante el uso del anticuerpo anti-CD3 generado en levaduras y células de mamíferos. La detección se realizó mediante el uso de un anticuerpo secundario anti-roedor conjugado biotinilado, y se desarrolló con un derivado de HRP-estreptavidina. Las imágenes son campos representativos de los portaobjetos tratados con cada anticuerpo recombinante. El fondo es el control para el desarrollo y llevado a cabo en ausencia del anticuerpo anti-CD3 primario.

Descripción detallada de las modalidades

Las proteínas de inmunoglobulinas heteromultiméricas recombinantes se secretan a partir de cepas diploides de levaduras *Pichia* de apareamiento competente. Un par de células haploides marcadas genéticamente de levadura *Pichia pastoris* se transforman con vectores de expresión que comprenden subunidades de la proteína de inmunoglobulina heteromultimérica. Una célula haploide comprende un primer vector de expresión, y una segunda célula haploide comprende un segundo vector de expresión. Opcionalmente, los vectores de expresión adicionales pueden introducirse en las células haploides o diploides; o el primer o segundo de los vectores de expresión pueden comprender secuencias codificantes adicionales para la síntesis de heterotrímeros; heterotetrámeros; etcétera. Los niveles de expresión de los polipéptidos no idénticos pueden calibrarse individualmente, y ajustarse a través de la selección apropiada, el número de copias del vector, la fuerza y/o la inducción del promotor y similares. Las células haploides transformadas se cruzan o fusionan genéticamente. Las cepas diploides o tetraploides resultantes se utilizan para producir y secretar proteínas de inmunoglobulinas heteromultiméricas, completamente ensambladas y biológicamente funcionales.

El uso de células diploides o tetraploides para la producción de proteínas proporciona beneficios inesperados. Las células pueden cultivarse para propósitos de producción, es decir, escalarse, y por períodos de tiempo prolongados, en condiciones que pueden ser perjudiciales para el crecimiento de las células haploides, cuyas condiciones pueden incluir una alta densidad celular; crecimiento en medio mínimo; crecimiento a bajas temperaturas; crecimiento estable en ausencia de presión selectiva; y que pueden proporcionar un mantenimiento de la integridad de secuencia de los genes heterólogos y el mantenimiento de la expresión de alto nivel con el tiempo. Estos beneficios pueden surgir, al menos en parte, de la creación de cepas diploides a partir de dos cepas haploides parentales distintas. Tales cepas haploides pueden comprender numerosas mutaciones autotróficas menores, cuyas mutaciones se complementan en los diploides o tetraploides, lo que permite el crecimiento bajo condiciones altamente selectivas.

Definiciones

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros de animales, y reactivos particulares, descritos y como tal pueden variar. Se deberá entender, además, que la terminología que se usa en la presente descripción es para el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante del alcance de la presente invención la cual se limitará solamente por las reivindicaciones anexas.

Como se usan en la presente descripción, las formas singulares "un", "uno/una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "la proteína" incluye la referencia a una o más proteínas y equivalentes de estas conocidos por los expertos en la técnica, etcétera. A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Especies de levaduras de apareamiento competente. Existen tales especies de levaduras en una forma haploide y diploide. Las células diploides pueden, bajo condiciones apropiadas, proliferar por número indefinido de generaciones en la forma diploide. Las células diploides pueden, además, producir esporas para formar células haploides. Adicionalmente, el apareamiento secuencial puede resultar en cepas tetraploides a través de apareamiento adicional de los diploides auxotróficos.

De acuerdo con la invención, la levadura de apareamiento competente es un miembro de las especies de *Pichia pastoris*.

Célula Haploide de Levadura: Una célula que tiene una única copia de cada gen de su complemento (cromosómico) genómico normal.

Célula Diploide de Levadura: Una célula que tiene dos copias (alelos) de cada gen de su complemento genómico normal, típicamente, formado por el proceso de fusión (apareamiento) de dos células haploides.
Célula Tetraploide de Levadura. Una célula que tiene cuatro copias (alelos) de cada gen de su complemento genómico normal, típicamente, formado por el proceso de fusión (apareamiento) de dos células haploides. Los tetraploides pueden llevar dos, tres, o cuatro casetes diferentes. Tales tetraploides pudieran obtenerse en *Pichia pastoris* mediante apareamiento secuencial de haploides para obtener diploides auxotróficos. Por ejemplo, un haploide [met his] puede aparease con el haploide [ade his] para obtener el diploide [his]; y un haploide [met arg] puede aparearse con el haploide [ade arg] para obtener el diploide [arg]; entonces el diploide [his] x diploide [arg] se obtiene un tetraploide prototrófico. Se entenderá por los expertos en la técnica que la referencia a los beneficios y usos de células diploides puede aplicarse, además, a células tetraploides.

Apareamiento de levaduras: El proceso por el cual dos células haploides de levadura, se fusionan naturalmente para formar una célula de levadura diploide.

Meiosis: El proceso por el cual una célula de levadura diploide experimenta división reductiva para formar cuatro productos de esporas haploides. Cada espora puede después germinar y formar una línea celular de crecimiento vegetativamente haploide.

Marcador seleccionable: Un marcador seleccionable es un gen o fragmento de gen que confiere un fenotipo de crecimiento (característica de crecimiento físico) en una célula que recibe ese gen como, por ejemplo a través de un evento de transformación. El marcador seleccionable permite a esa célula sobrevivir y crecer en un medio de crecimiento selectivo, bajo condiciones en las que las células que no reciben ese gen marcador seleccionable, no puedan crecer. Los genes marcadores seleccionables generalmente se dividen en varios tipos, que incluyen los genes marcadores seleccionables positivos, tal como un gen que confiere a una célula resistencia a un antibiótico u otro fármaco, temperatura cuando dos mutantes ts se cruzan o un mutante ts se transforma; genes marcadores de selección negativos, tal como un gen de biosíntesis que confiere a una célula la capacidad de crecer en un medio sin un nutriente específico necesario por todas las células que no tienen ese gen biosintético, o un gen biosintético mutagenizado que confiere a una célula la incapacidad para crecer por las células que no tienen el gen silvestre; y similares. Los marcadores adecuados incluyen, pero sin limitarse a: ZEO; G418; HIS 5; LYS3; MET1; MET3a; ADE1; ADE3; URA3; y similares.

Vector de expresión: Estas especies de ADN que contienen elementos que facilitan la manipulación para la expresión de una proteína extraña dentro de la célula huésped objetivo. Convenientemente, la manipulación de secuencias y producción de ADN para la transformación se lleva a cabo primero en un huésped bacteriano, por ejemplo, E. coli, y usualmente los vectores incluirán secuencias para facilitar tales manipulaciones, lo que incluye un origen bacteriano de replicación y un marcador de selección bacteriana apropiado. Los marcadores seleccionables codifican proteínas necesarias para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en los medios complejos.

Los vectores de expresión para uso en los métodos de la invención incluirán además secuencias específicas de levadura, lo que incluye un marcador auxotrófico o de fármaco, seleccionable para la identificación de cepas de levadura transformadas. Un marcador de fármaco puede, además, usarse para amplificar el número de copias del vector en una célula huésped de levadura.

La secuencia codificante del polipéptido de interés está unida operativamente a secuencias transcripcionales y traduccionales que tienen en cuenta la expresión del polipéptido en células de levadura. Estos componentes del vector pueden incluir, pero sin limitarse a, uno o más de los siguientes: un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. Las secuencias para la secreción del polipéptido pueden, además, incluir, por ejemplo, una secuencia señal, y similares. Un origen de levadura de replicación es opcional, como vectores de expresión frecuentemente se integran en el genoma de la levadura.

En una modalidad de la invención, el polipéptido de interés está unido operativamente, o fusionado, a las secuencias que proporcionan la secreción optimizada del polipéptido a partir de células diploides de levadura *Pichia pastoris*.

Los ácidos nucleicos están "unidos operativamente" cuando se colocan en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal está unido operativamente al ADN para un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si este afecta la transcripción de la secuencia. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes o, alternativamente, a través de un método de PCR/recombinación familiar para los expertos en la técnica (GatewayR Technology; Invitrogen, Carlsbad California). Si

esos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores sintéticos del oligonucleótido se usan de acuerdo con la práctica convencional.

Los promotores son secuencias no traducidas localizadas aguas arriba (5') al codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y traducción de la secuencia de ácido nucleico particular a la que está unida operativamente. Tales promotores se dividen en varias clases: promotores inducibles, constitutivos, y reprimibles, que aumentan los niveles de la transcripción en respuesta a la ausencia de un represor. Los promotores inducibles pueden iniciar niveles aumentados de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

El fragmento promotor de levadura puede servir, además, como el sitio para la recombinación homóloga y la integración del vector de expresión en el mismo sitio en el genoma de la levadura; alternativamente, un marcador seleccionable se usa como el sitio para la recombinación homóloga. La transformación de *Pichia* se describe en Cregg y otros, (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385.

Ejemplos de promotores adecuados de *Pichia* incluyen el promotor AOX1 y (Cregg y otros (1989) Mol. Cell. Biol. 9:1316-1323); el promotor ICL1 (Menéndez y otros (2003) Yeast 20(13):1097-108); el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) (Waterham y otros (1997) Gene 186(1):37-44); y el promotor FLD1 (Shen y otros (1998) Gene 216(1):93-102). El promotor GAP es un promotor constitutivo fuerte y los promotores AOX y FLD1 son inducibles.

Los polipéptidos de interés pueden producirse de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, por ejemplo, una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal del polipéptido o proteína madura. Generalmente, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte de la secuencia codificante del polipéptido que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y se procesa a través de una de las vías estándar disponibles dentro de la célula huésped. El factor alfa pre-pro señal de S. cerevisiae ha demostrado ser efectivo en la secreción de una variedad de proteínas recombinantes de *P. pastoris*. Las señales de secreción de interés incluyen, además, secuencias señal de mamíferos, que pueden ser heterólogas para la proteína que es secretada, o puede ser una secuencia nativa para la proteína que es secretada. Las secuencias señal incluyen secuencias de prepéptidos, y en algunos casos pueden incluir secuencias de propéptidos. Muchas de estas secuencias señal se conocen en la técnica, que incluyen las secuencias señal encontradas en cadenas de inmunoglobulinas, por ejemplo, la secuencia de preprotoxina K28, PHA-E, FACE, MCP-1 humana, las secuencias señal de albúmina sérica humana, la cadena pesada de Ig humana, la cadena ligera de Ig humana, y similares. Por ejemplo, ver Hashimoto y otros, Protein Eng 11(2) 75 (1998); y Kobayashi y otros, Therapeutic Apheresis 2(4) 257 (1998).

La transcripción puede aumentarse mediante inserción de una secuencia activadora de la transcripción en el vector. Estos activadores son elementos que actúan en cis del ADN, usualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los potenciadores de la transcripción son relativamente independientes de la orientación y posición, se han encontrado 5' y 3' en la unidad de transcripción, dentro de un intrón, así como también dentro de la propia secuencia codificante. El potenciador puede empalmarse en el vector de expresión en una posición 5' o 3' en la secuencia codificante, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en las células huésped eucariotas pueden contener, además, secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de 3' hacia el codón de terminación de la traducción, en las regiones no traducidas de ADN o ADNc de eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente enumerados, emplea técnicas estándar de ligación o métodos de PCR/recombinación. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN se escinden, se adaptan, y se ligan de nuevo en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos, o a través de métodos de recombinación. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, las mezclas de ligación se usan para para transformar células huésped, y los transformantes exitosos se seleccionan mediante resistencia a antibióticos (por ejemplo ampicilina o Zeocin) según sea apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción y/o se secuencian.

Como alternativa a la restricción y la ligación de fragmentos, los métodos de recombinación basados en sitios att y enzimas de recombinación pueden usarse para insertar secuencias de ADN en un vector. Tales métodos se describen, por ejemplo, por Landy (1989) Ann.Rev.Biochem. 58:913-949; y son conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos utilizan la recombinación del ADN intermolecular que está mediada por una mezcla de proteínas de recombinación codificadas por lambda y E. coli. La recombinación ocurre entre sitios específicos de unión (att) en las moléculas de ADN que interactúan. Para una descripción de los sitios att ver Weisberg y Landy (1983) Site-Specific Recombination in Phage Lambda, en Lambda II, Weisberg, ed. (Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Press), pp.211-250. Los segmentos de ADN que flanquean los sitios de recombinación se conmutan, de manera que después

de la recombinación, los sitios att son secuencias híbridas que constan de secuencias donadas por cada vector parental. La recombinación puede ocurrir entre los ADN de cualquier topología.

Los sitios att pueden introducirse en una secuencia de interés mediante ligación de la secuencia de interés en un vector apropiado; lo que genera un producto de PCR que contiene sitios B att a través del uso de cebadores específicos; lo que genera una genoteca de ADNc clonado en un vector apropiado que contiene sitios att; y similares.

El plegado, como se usa en la presente descripción, se refiere a la estructura tridimensional de polipéptidos y proteínas, donde las interacciones entre los residuos de aminoácidos actúan para estabilizar la estructura. Mientras que las interacciones no covalentes son importantes en la determinación de la estructura, usualmente las proteínas de interés tendrán enlaces disulfuro covalentes intra e/o intermoleculares formados por dos residuos de cisteína. Para proteínas y polipéptidos o derivados de origen natural y variantes de estos, el plegado correcto es típicamente la disposición que resulta en una actividad biológica óptima, y puede, convenientemente, monitorearse mediante ensayos de actividad, por ejemplo, por unión de ligandos, por actividad enzimática, etcétera.

En algunos casos, por ejemplo cuando el producto deseado es de origen sintético, los ensayos basados en actividad biológica serán menos significativos. El plegado correcto de tales moléculas puede determinarse sobre la base de las propiedades físicas, consideraciones energéticas, estudios de modelación, y similares.

El huésped de expresión puede modificarse aún más mediante la introducción de secuencias que codifican una o más enzimas que mejoran el plegado y formación de enlaces disulfuro, es decir, foldasas, chaperoninas, etcétera. Tales secuencias pueden expresarse de forma constitutiva o inducible en la célula huésped de levadura, mediante el uso de vectores, marcadores, etcétera, como se conoce en la técnica. Preferentemente, las secuencias, que incluyen los elementos reguladores de la transcripción suficientes para el patrón deseado de expresión, se integran de forma estable en el genoma de la levadura a través de una metodología específica.

Por ejemplo, el PDI eucariota no es sólo un catalizador eficiente de la oxidación de cisteína de proteínas e isomerización de enlaces disulfuro, sino que también muestra actividad chaperona. La coexpresión de PDI puede facilitar la producción de proteínas activas que tienen múltiples enlaces disulfuro. Además es de interés la expresión de BIP (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulinas); ciclofilina; y similares. En una modalidad de la invención, cada una de las cepas parentales haploides expresa una enzima de plegado distinta, por ejemplo, una cepa puede expresar BIP, y la otra cepa puede expresar PDI.

Los términos "proteína deseada" o "proteína objetivo" se usan indistintamente, y se refieren generalmente a cualquier proteína secretada que tiene 2 o más cadenas polipeptídicas no idénticas, donde tales cadenas se sintetizan independientemente, es decir, no resultan de la escisión postraduccional de una única cadena polipeptídica. Los polipéptidos son heterólogos, es decir, extraños, para la levadura. Preferentemente, se usan polipéptidos de mamíferos, es decir, polipéptidos codificados en un genoma de mamífero.

En una modalidad preferida, la proteína es un anticuerpo. El término "anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molecular que contiene cadenas polipeptídicas con una forma específica que se adapte a y reconoce un epítopo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítopo. La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etcétera, de todas las fuentes, por ejemplo, de humanos, de roedor, de conejo, de vaca, de oveja, de cerdo, de perro, de otros mamíferos, de pollo, de otras aves, etcétera, se consideran que son "anticuerpos". Numerosas secuencias codificantes de anticuerpos se han descrito; y otras pueden originarse por métodos bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos pueden producirse por ingeniería genética. En esta técnica, como con otros métodos, las células productoras de anticuerpos se sensibilizan al antígeno o inmunógeno deseado. El ARN mensajero aislado de células productoras de anticuerpos se usa como un molde para hacer ADNc mediante el uso de la amplificación por PCR. Una genoteca de vectores, que cada uno contiene un gen de la cadena pesada y un gen de cadena ligera, que retienen la especificidad inicial por el antígeno, se produce mediante la inserción de secciones apropiadas del ADNc amplificado de inmunoglobulina en los vectores de expresión. Una genoteca combinatoria se construye mediante combinación de la genoteca de los genes de la cadena pesada con la genoteca de genes de la cadena ligera. Esto resulta en una genoteca de clones que coexpresan una cadena pesada y una ligera (que se asemeja el fragmento Fab o fragmento de unión al antígeno o a una molécula de anticuerpo). Los vectores que llevan estos genes son cotransfectados en una célula huésped. Cuando se induce la síntesis de genes de anticuerpos en el huésped transfectado, las proteínas de cadena pesada y ligera se autoensamblan para producir anticuerpos activos que pueden detectarse mediante la selección con el antígeno o inmunógeno.

Las secuencias codificantes de anticuerpos de interés incluyen las codificadas por secuencias nativas, así como también ácidos nucleicos que, en virtud de la redundancia del código genético, no son idénticas en secuencia a los ácidos nucleicos descritos, y variantes de estos. Las variantes de polipéptidos pueden incluir sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos (aa). Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas o sustituciones para eliminar aminoácidos no esenciales, tales como para alterar un sitio de glicosilación,

o para minimizar el plegado incorrecto por sustitución o deleción de uno o más residuos de cisteína que no son necesarios para la función. Las variantes pueden diseñarse con el fin de retener o tener actividad biológica potenciada de una región particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional, los residuos aminoácidos catalíticos, etcétera). Las variantes incluyen, además, fragmentos de los polipéptidos descritos en la presente descripción, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales. Se conocen técnicas para mutagénesis in vitro de genes clonados. En la materia de la invención se incluyen, además, polipéptidos que han sido modificados mediante el uso de técnicas biológicas moleculares normales a fin de mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como un agente terapéutico.

Los anticuerpos quiméricos pueden prepararse por medios recombinantes mediante la combinación de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada (VK y VH), obtenidas a partir de células productoras de anticuerpos de una especie con regiones constantes de las cadenas ligera y pesada de otra. Típicamente, los anticuerpos quiméricos utilizan regiones variables de roedores o de conejo y regiones constantes de humanos, con para producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. La producción de tales proteínas quiméricas se conocen en la técnica, y pueden lograrse por medios estándar (como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 5,624,659).

Los anticuerpos humanizados se diseñan para contener aún más dominios de inmunoglobulinas semejantes a las humanas, e incorporar sólo las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de un animal. Esto se logra mediante el examen cuidadoso de la secuencia de los lazos hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal, y ajuste de ellos a la estructura de las cadenas de anticuerpos humanos. Aunque facialmente complejo, el proceso es sencillo en la práctica. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,187,287.

Adicionalmente a las inmunoglobulinas enteras (o sus homólogos recombinantes), pueden sintetizarse los fragmentos de inmunoglobulinas que comprenden el sitio de unión al epítopo (por ejemplo, Fab', F(ab')2, u otros fragmentos). Las inmunoglobulinas mínimas o "fragmento", pueden diseñarse mediante la utilización de técnicas de inmunoglobulinas recombinantes. Por ejemplo las inmunoglobulinas "Fv" para uso en la presente invención pueden producirse mediante la síntesis de una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada. Las combinaciones de anticuerpos son además de interés, por ejemplo, diacuerpos, que comprenden dos especificidades Fv distintas.

Las inmunoglobulinas pueden modificarse postraduccionalmente, por ejemplo, para añadir enlazadores químicos, porciones detectables, tales como colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, porciones quimioluminiscentes y similares, o porciones de unión específica, tales como estreptavidina, avidina, o biotina, y similares pueden utilizarse en los métodos y composiciones de la presente invención.

Métodos de síntesis de polipéptidos

Las células de levadura haploides de apareamiento competente transformadas proporcionan un método genético que permite el apareamiento de subunidades de una proteína deseada. Las cepas haploides de levadura *Pichia pastoris* se transforman con cada uno de dos vectores de expresión, un primer vector para dirigir la síntesis de una cadena polipeptídica y un segundo vector para dirigir la síntesis de una segunda cadena polipeptídica, no idéntica. Las dos cepas haploides de *Pichia pastoris* se aparean para proporcionar un huésped diploide donde puede obtenerse la producción optimizada de proteína objetivo.

Opcionalmente, se proporciona(n) secuencia(s) codificante(s) no idéntica(s) adicional(es). Tales secuencias pueden estar presentes en vectores de expresión adicionales o en el primer o el segundo de los vectores de expresión. Como se conoce en la técnica, múltiples secuencias codificantes pueden expresarse de forma independiente a partir de promotores individuales; o pueden expresarse de forma coordinada a través de la inclusión de un "sitio de entrada al ribosoma interno" o "IRES", que es un elemento que promueve el acceso directo al ribosoma interno, al codón de iniciación, tal como ATG, de un cistrón (una región que codifica la proteína), lo que conduce, de esta manera, a la traducción del gen independiente de la caperuza. Los elementos IRES funcionales en levadura se describen por Thompson y otros, (2001) P.N.A.S. 98:12866-12868.

En una modalidad de la invención, las secuencias de anticuerpos se producen en combinación con una cadena secretora J, que tiene en cuenta la estabilidad mejorada de IgA (ver patentes de Estados Unidos núms. 5,959,177; y 5,202,422).

Las dos cepas haploides de levadura son cada una auxótrofa, y requieren la suplementación de los medios para el crecimiento de las células haploides. El par de auxótrofos son complementarios, de manera que el producto diploide crecerá en ausencia de los suplementos necesarios para las células haploides. Muchos de estos marcadores genéticos se conocen en la levadura, lo que incluyen los requerimientos para los aminoácidos (por ejemplo, met, lys, his, arg, etcétera), nucleósidos (por ejemplo ura3, ade1, etcétera); y similares. Los marcadores de aminoácidos pueden ser preferidos para los métodos de la invención.

Las dos células haploides transformadas pueden cruzarse genéticamente y las cepas diploides que se originan de este

evento de apareamiento, se seleccionaron por sus requerimientos nutricionales híbridos. Alternativamente, las poblaciones de las dos cepas haploides transformadas se convierten en esferoplastos y se fusionan, y la progenie diploide se regeneró y seleccionó. Por cualquier método, las cepas diploides pueden identificarse y cultivarse de forma selectiva, ya que, a diferencia de sus parentales haploides, ellas no tienen las mismas necesidades nutricionales. Por ejemplo, las células diploides pueden cultivarse en medio mínimo. La estrategia de síntesis diploide tiene ciertas ventajas. Las cepas diploides tienen el potencial para producir niveles mejorados de proteínas heterólogas a través de la complementación más amplia con mutaciones subyacentes, que pueden afectar la producción y/o secreción de la proteína recombinante.

En una modalidad de la invención, cada una de las cepas haploides de *Pichia pastoris* se transforma con una biblioteca de polipéptidos, por ejemplo, una biblioteca de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos. Las células haploides transformadas que sintetizan los polipéptidos se aparean con las células haploides complementarias. Las células diploides resultantes se seleccionan para la proteína funcional. Las células diploides proporcionan un medio de llevar rápido, conveniente y económicamente, de forma simultánea a un gran número de combinaciones de polipéptidos para las pruebas funcionales. Esta tecnología es especialmente aplicable para la generación de productos de proteínas heterodiméricas, donde los niveles de síntesis optimizada de subunidades son críticos para la expresión y la secreción de la proteína funcional.

En otra modalidad de la invención, la relación del nivel de expresión de las dos subunidades se regula para maximizar la generación de productos. Los niveles de proteína de la subunidad del heterodímero se ha demostrado previamente que afectan la generación del producto final (Simmons LC, J Immunol Methods. 2002 May 1;263(1-2):133-47). La regulación puede lograrse antes de la etapa de apareamiento, mediante la selección para un marcador presente en el vector de expresión. Al aumentar de forma estable el número de copias del vector, el nivel de expresión puede aumentarse. En algunos casos, puede ser deseable aumentar el nivel de una cadena con relación a la otra, para alcanzar una proporción equilibrada entre las subunidades del polipéptido. Los marcadores de resistencia a antibióticos son útiles para este propósito, por ejemplo, el marcador de resistencia a Zeocin, resistencia a G418, etcétera, y proporcionar un medio de enriquecimiento para las cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa mediante la selección de los transformantes que son resistentes a niveles superiores de Zeocin o G418. La relación adecuada, por ejemplo 1:1; 1:2; etcétera, de los genes de las subunidades puede ser importante para la producción de proteínas eficientes. Aun cuando el mismo promotor se usa para transcribir ambas subunidades, muchos otros factores contribuyen al nivel final de proteína expresada y, por tanto, puede ser útil aumentar el número de copias de un gen codificado con relación al otro. Alternativamente, las cepas diploides que producen niveles más altos de un polipéptido, con relación a cepas con una sola copia del vector, se crean mediante apareamiento de dos cepas haploides, ambas de las cuales tienen múltiples copias de los vectores de expresión.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente, se aparean para formar cepas diploides, y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado, para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Se conocen en la técnica un número de medios mínimos adecuados para el crecimiento de la levadura. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, elementos traza, y glucosa o una fuente de energía equivalente. Además pueden incluirse cualquiera de otros suplementos necesarios, a concentraciones adecuadas que pudieran ser conocidas para los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para el experto en la técnica.

Las proteínas secretadas se recuperan del medio de cultivo. Un inhibidor de proteasas, tal como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios. La composición puede concentrarse, filtrarse, dializarse, etcétera, mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

Las células diploides de *Pichia pastoris* de la invención se cultivan con fines de producción. Tales fines de producción incluyen convenientemente el crecimiento en medio mínimo, cuyo medio carece de aminoácidos preformados y otras biomoléculas complejas, por ejemplo, el medios que comprende amoniaco como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de energía y carbono, y sales como una fuente de fosfato, calcio y similares. Preferentemente tal medio de producción carece de agentes selectivos tales como antibióticos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, etcétera. Las células diploides pueden cultivarse para una alta densidad celular, por ejemplo al menos aproximadamente 50 g/L; más usualmente al menos aproximadamente 100 g/L; y puede ser al menos aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500 g/L o más.

En una modalidad de la invención, el crecimiento de las células en cuestión para fines de producción se realiza a temperaturas bajas, cuyas temperaturas pueden disminuirse durante la fase logarítmica, durante la fase estacionaria, o ambas. El término "temperatura baja" se refiere a temperaturas de al menos aproximadamente 15 °C, más usualmente al menos aproximadamente 17 °C, y puede ser de aproximadamente 20 °C, y es usualmente de no más de aproximadamente 25 °C, más usualmente no más de aproximadamente 22 °C. La temperatura de crecimiento puede afectar la producción de proteínas secretadas de longitud completa en cultivos de producción, y la disminución de la

temperatura de crecimiento del cultivo puede incrementar fuertemente el rendimiento del producto intacto. La temperatura disminuida parece ayudar a la circulación intracelular a través de las vías de procesamiento de plegado y postraduccionales, usadas por el huésped para generar el producto objetivo, junto con la reducción de la degradación de proteasas celulares.

Los métodos de la invención tienen en cuenta la expresión de la proteína activa, secretada, particularmente, anticuerpos activos, secretados, donde "anticuerpos activos", como se usa en la presente descripción, se refiere a un multímero correctamente plegado de al menos dos cadenas correctamente apareadas, que se une con precisión a su antígeno cognado. Los niveles de expresión de proteína activa son usualmente al menos aproximadamente 50 mg/litro de cultivo, más usualmente al menos aproximadamente 100 mg/litro, preferentemente al menos aproximadamente 500 mg/litro, y puede ser de 1000 mg/litro o más.

Los métodos de la invención pueden proporcionar una mayor estabilidad del huésped de *Pichia pastoris* y de las secuencias codificantes heterólogas durante la producción. La estabilidad se evidencia, por ejemplo, mediante el mantenimiento de altos niveles de expresión de tiempo, donde el nivel de partida de la expresión se reduce en no más de aproximadamente 20 %, usualmente no más de 10 %, y puede disminuirse por no más de aproximadamente 5 % durante aproximadamente 20 duplicaciones, 50 duplicaciones, 100 duplicaciones, o más.

La estabilidad de la cepa de *Pichia pastoris* considera, además, el mantenimiento de la integridad de la secuencia génica heteróloga con el tiempo, donde la secuencia de la secuencia codificante activa y de los elementos reguladores de la transcripción esenciales se mantienen en al menos aproximadamente el 99 % de las células diploides, normalmente en al menos aproximadamente 99.9% de la células diploides, y preferentemente, en al menos aproximadamente 99.99 % de las células diploides durante aproximadamente 20 duplicaciones, 50 duplicaciones, 100 duplicaciones, o más. Preferentemente, sustancialmente todas las células diploides mantienen la secuencia de la secuencia codificante activa y de los elementos reguladores transcripcionales esenciales.

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones y reactivos particulares descritos, ya que esos, por supuesto, pueden variar. Debe entenderse, además, que la terminología que se usa en la presente descripción es para el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante del alcance de la presente invención la cual se limitará solamente por las reivindicaciones anexas.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo, y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción al llevar a la práctica o probar la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen ahora.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente descripción son para el propósito de describir, por ejemplo, las líneas celulares, construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, que pudieran usarse en relación con la invención descrita en la presente. Las publicaciones discutidas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan solamente para su descripción previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente invención debe interpretarse como una aceptación de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha descripción en virtud de invención previa.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la invención en cuestión, y no pretenden limitar el alcance de lo que se considera como la invención según se define en las reivindicaciones. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etcétera), pero deben tomarse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otra forma, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es a, o cerca de, la atmosférica.

Experimentos

Ejemplo 1

Para demostrar la eficacia del método de producción de anticuerpos de diploides se prepararon los siguientes reactivos.

Genes de anticuerpos: Los genes se clonaron y construyeron de manera que dirigieron la síntesis de tres formas de un anticuerpo monoclonal OKT3 de ratón humanizado quimérico. Las fuentes de las regiones variables para su uso en estas construcciones pueden encontrarse en Genbank. Número de acceso A22261; cadena pesada OKT3 de ratón (solicitud de patente Internacional núm. WO 9109967-A3 11-JUL-1991). Número de acceso A22259; cadena ligera OKT3 de ratón (solicitud de patente internacional núm. WO 9109967-A3 11-JUL-1991).

Las tres formas utilizaron el gen de cadena ligera VκCκ idéntico (sec. con núm. de ident. 10). Para los tres genes de

cadena pesada, todos codificaron la región variable de ratón idéntica (Vh) pero se diferenciaron entre sí en la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada humana. El primer constructo dirigió la síntesis de una cadena pesada silvestre de longitud completa (Cγ1) con su sitio de glicosilación normal con enlace a N presente (cadena pesada glicosilada de longitud completa (sec. con núm. de ident. 13 y núm. 14). El segundo gen dirigió la síntesis de una cadena pesada no glicosilada creado por la mutación de un nucleótido en la secuencia, de modo que una treonina en la posición 301 se cambió a una alanina en la secuencia de reconocimiento del sitio de glicosilación (ASN-X-Thr/Ser) (cadena pesada no glicosilada de longitud completa) (sec. con núm. de ident. 15). El tercer constructo génico dirigió la síntesis de una cadena pesada en la que se eliminó la mayor parte de la región constante después de la región bisagra (Fab de cadena pesada) (sec. con núm. de ident.: 16).

Vector de expresión: El vector contiene los siguientes componentes funcionales: 1) un origen de replicación ColE1 mutante, que facilita la replicación del vector plasmídico en las células de la bacteria Escherichia coli; 2) un gen Sh ble bacteriano, que confiere resistencia al antibiótico Zeocin y sirve como el marcador seleccionable para transformaciones tanto de E. coli como de *P. pastoris*; 3) un casete de expresión compuesto por el promotor del gen de gliceraldehído deshidrogenasa (gen GAP), fusionado a secuencias que codifican la secuencia líder de pre prosecreción del factor de apareamiento alfa de *Saccharomyces* cerevisiae, seguido por las secuencias que codifican una señal de terminación transcripcional de *P. pastoris* del gen de alcohol oxidasa I (AOX1) de *P. pastoris*. El gen marcador de resistencia a Zeocin proporciona un medio de enriquecimiento para las cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa mediante la selección de los transformantes que son resistentes a mayores niveles de Zeocin.

Cepas de *P. pastoris*: Las cepas auxotróficas usadas para este ejemplo son las cepas ade1 y ura3 de *P. pastoris*, que requieren la suplementación con adenina y uracilo, respectivamente, para el crecimiento. Se han usado, además, las cepas met1 y lys3. Aunque cualquiera de los dos conjuntos de complementación de cepas auxotróficas de *Pichia pastoris* podrían usarse para la construcción y mantenimiento de cepas diploides, estas dos cepas se adaptan especialmente para este método por dos razones. En primer lugar, crecen más lentamente que las cepas diploides que son el resultado de su apareamiento o fusión. Así, si un pequeño número de células haploides ade1 o ura3 permanecen presentes en un cultivo o se originan a través de meiosis u otro mecanismo, la cepa diploide debe superarlas en cultivo.

En segundo lugar es fácil de controlar el estado sexual de estas cepas ya que las colonias del producto diploide de su apareamiento son de un color blanco o crema normal, mientras que las células de cualquiera de las cepas que son mutantes ade1 haploides en un cultivo forman una colonia con distinto color rosado. Adicionalmente, cualquiera de las cepas que son mutantes ura3 haploides son resistentes al fármaco ácido 5-fluoro-orótico (FOA) y pueden identificarse con sensibilidad mediante la siembra en placas de muestras de un cultivo de medio mínimo + uracilo con FOA. En estas placas, solamente las cepas mutantes ura3 que requieren uracilo (presumiblemente haploides) pueden crecer y formar colonias. Así, con cepas parentales haploides marcadas con ade1 y ura3, una puede controlar fácilmente el estado sexual de las cepas diploides productoras de anticuerpos resultantes (haploides frente a diploides).

Métodos

Construcción de vectores de expresión pGAPZ-alfa para la transcripción de genes de la cadena pesada y ligera de anticuerpos. Para la clonación de las regiones variables, tanto de la cadena ligera como de la pesada, las células de una línea celular de hibridoma de ratón OKT3 CD3 se cultivaron y se extrajo el ARN total. Se realizaron después dos reacciones de RT-PCR, una específica para la cadena ligera y una específica para la cadena pesada de las secuencias que codifican la región variable de los genes de anticuerpos OKT3. Los cebadores empleados para amplificar la región variable de cadena pesada y ligera fueron (sec. con núm. de ident.:1) 5'-CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTC-3' y (sec. con núm. de ident.:3) 5'-CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCC-3' junto con (sec. con núm. de ident.:2) 5'-TGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGC-3' y (sec. con núm. de ident.:4) 5'-GACAGATGGTGCAGCCACAGCCCGG TTTATTTCCAACTTTGTCC-3' para las respectivas regiones variables.

Para los genes humanos de la región constante de la cadena pesada y ligera, se adquirió una extensión 5' más genoteca de ADNc de leucocitos humanos de Clontech (HL 5019t). Dos reacciones de PCR se realizaron en esta genoteca mediante el uso de cebadores específicos para las regiones constantes de la cadena pesada y ligera, respectivamente (cadena pesada: (sec. con núm. de ident.:6) 5'-GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA-3 and (sec. con núm. de ident.:5) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAG-3' para la longitud completa junto con (sec. con núm. de ident.:7) 5'-TGCGGCCGCTCATGGGCACGGTGGGCATGTGT-3' para la generación de Fab'; cadena ligera: (sec. con núm. de ident.:9) 5'-GGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGTGGCTGCACCATCTGTC-3' and (sec. con núm. de ident.:8) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT-3'.

Una secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de ratón se fusionó en el marco a una secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera humana (sec. con núm. de ident.: 11 y sec. con núm. de ident.:12). Un fragmento que codifica el constructo de fusión final se insertó en el vector de expresión pGAPZ-alfa de *P. pastoris*, a través de la ligación de los sitios 5'-Xhol y 3'-Notl en pGAPZ-alfa. La secuencia de ADN que codifica la región variable pesada de ratón se fusionó en marco a secuencias que codifican cada una de las tres regiones constantes de la cadena pesada humana. Estos productos de fusión se insertaron después mediante el uso de una estrategia similar de 5'-Xhol y 3'-Notl en pGAPZ-alfa. (sec. con núm. de ident.:13 y sec. con núm. de ident.: 14 para la versión glicosilada;

sec. con núm. de ident.: 15 para la versión aglicosilada; sec. con núm. de ident.: 16 para el fragmento Fab). Las secuencias de ADN de genes de anticuerpos adecuados en todos los vectores se confirmaron mediante secuenciación directa del ADN antes de continuar el trabajo.

Transformación de los vectores de expresión en cepas de *P. pastoris* haploides ade1 ura3, met1 y lys3. Todos los métodos usados para la transformación de cepas haploides de *P. pastoris* y la manipulación genética del ciclo sexual de *P. pastoris* fueron como se describe en Higgins, D. R., y Cregg, J. M., Eds. 1998. *Pichia* Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ.

Antes de la transformación, cada vector de expresión se linealizó dentro de las secuencias promotoras de GAP con AvrII para dirigir la integración de los vectores en el locus del promotor de GAP del genoma de *P. pastoris*. Las muestras de cada vector se transformaron individualmente en cultivos electrocompetentes de las cepas ade1, ura3, met1 y lys3 por electroporación y los transformantes exitosos se seleccionaron en placas YPD Zeocin por su resistencia a este antibiótico. Se seleccionaron las colonias resultantes, se aplicaron por rayado a partir de colonias individuales sobre placas de YPD Zeocin y después se examinaron para la presencia del inserto del gen de anticuerpo mediante un ensayo de PCR en el ADN genómico extraído de cada cepa, para el inserto del gen de anticuerpo apropiado y/o por la capacidad de cada cepa para sintetizar una cadena de anticuerpo mediante un método de inmunotransferencia/elevación de colonias (Wung y otros, Biotechniques 21 808-812 (1996). Las cepas haploides ade1, met1 y lys3 que expresan uno de los tres constructos de cadena pesada se recogieron para las construcciones diploides junto con la cepa haploide ura3 que expresa el gen de la cadena ligera. Los haploides que expresan los genes de la cadena pesada se aparearon con los haploides apropiados ura3 de la cadena ligera para generar diploide que secreta proteínas.

Apareamiento de cepas haploides que sintetizan una sola cadena de anticuerpo y selección de derivados diploides que sintetizan anticuerpos funcionales tetraméricos. Para aparear cepas haploides de *P. pastoris*, cada cepa ade1 (o met1 o lys3) que produce la cadena pesada para ser cruzada, se aplicó mediante rayado de un lado a otro de una placa rica en YPD y la cepa ura3 que produce la cadena ligera se aplicó mediante rayado de un lado a otro de una segunda placa de YPD (~10 rayas por placa). Después de uno o dos días de incubación a 30 °C, las células de una placa que contiene cepas de la cadena pesada y un placa que contiene cepas ura3 de cadena ligera, se transfirieron a una tela de terciopelo estéril en un bloque de réplica en placas en un patrón de rayado cruzado de manera que cada cepa de cadena pesada contenía un parche de células mezcladas con cada cepa de la cadena ligera. Las células de la réplica en placas con rayas cruzadas se transfirieron después a una placa de apareamiento y se incubaron a 25 °C para estimular el inicio del apareamiento entre las cepas. Después de dos días, las células en las placas de apareamiento se transfirieron de nuevo a una tela de terciopelo estéril en un bloque de réplica en placas y después se transfirieron a placas de medio mínimo. Estas placas se incubaron a 30 °C durante tres días para permitir el crecimiento selectivo de colonias de cepas diploides prototróficas. Las colonias que se originaron se seleccionaron y se aplicaron mediante rayado en una segunda placa de medio mínimo para aislar colonias individuales y purificar cada cepa diploide. Las líneas celulares diploides resultantes se examinaron después para la producción de anticuerpos.

Las cepas diploides putativas se probaron para demostrar que eran diploides y contenían ambos vectores de expresión para la producción de anticuerpos. Para la diploidía, las muestras de una cepa se extendieron sobre placas de apareamiento para estimularlas a pasar por la meiosis y formar esporas. Los productos de esporas haploides se recogieron y se ensayaron para el fenotipo. Si un porcentaje significativo de los productos de esporas resultantes fueron auxótrofos simples o dobles concluimos que la cepa original debe haber sido diploide. Las cepas diploides se examinaron para la presencia de ambos genes de anticuerpos mediante la extracción de ADN genómico de cada una y la utilización de este ADN en las reacciones de PCR específicas para cada gen.

Fusión de cepas haploides que sintetizan una sola cadena de anticuerpo y selección de derivados diploides que sintetizan anticuerpos funcionales tetraméricos. Como una alternativa al procedimiento de apareamiento descrito anteriormente, los cultivos individuales de cepas haploides ade1 y ura3 que producen una sola cadena de anticuerpo se convirtieron en esferoplastos, y sus esferoplastos resultantes se fusionaron mediante el uso polietilenglicol/CaCl2. Las cepas haploides fusionadas se incrustaron después en agar que contiene sorbitol 1 M y medio mínimo para permitir que las cepas diploides regeneren su pared celular y crezcan en colonias visibles. Las colonias resultantes se recogieron del agar, se aplicaron mediante rayado sobre una placa de medio mínimo, y las placas se incubaron durante dos días a 30 °C para generar colonias de células individuales de líneas de células diploides. Las líneas celulares diploides putativas resultantes se examinaron después para la diploidía y la producción de anticuerpos, como se describió anteriormente.

Purificación y análisis de anticuerpos. Una cepa diploide para la producción de anticuerpos de longitud completa se derivó a través del apareamiento de la cepa 2252 ura3 de cadena ligera y la cepa 2254 lys3 de cadena pesada mediante el uso de los métodos descritos anteriormente. Los medios de cultivo del frasco de agitación o cultivos del fermentador de cepas de expresión diploides de *P. pastoris* se recogieron y se examinaron para la presencia de proteína de anticuerpo a través de SDS-PAGE e inmunotransferencia mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra las cadenas pesada y ligera de IgG humana, o específicamente contra la cadena pesada de IgG. Los datos se muestran en la Figura 2.

Para purificar los anticuerpos de levadura secretados, el medio clarificado de cultivos que producen anticuerpos se

pasaron a través de una columna de proteína A y después mediante lavado con fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0, tampón de unión, la proteína unida a la proteína A se eluyó mediante el uso de 0.1 M de tampón glicina HCl, pH 3.0. Las fracciones que contenían la mayor parte de la proteína total se examinaron mediante SDS-PAGE teñido con Coomasie azul e inmunotransferencia para la proteína del anticuerpo. Las fracciones se examinaron, además, mediante un ensayo ELISA en el que las placas de microtitulación se recubrieron primero con anti-IgG humana F(ab')2 de cabra, Fcγ (Jackson Immuno, núm. Cat. 109-006-008). A continuación las placas se hicieron reaccionar con diluciones seleccionadas de anticuerpos producidos por levaduras. Finalmente, las placas se hicieron reaccionar con anticuerpo de cabra anti-fragmento F(ab')2 humano conjugado con HRP de IgG F(ab')2 (Jackson Immuno, núm. Cat. 109-036-097). Después las placas se desarrollaron con sustrato de TMP (Sigma Chemical) y las reacciones se inactivaron con 0.5 M de HCl. Los resultados se cuantificaron en un lector de placas de microtitulación de BioRad a 415 nm. El dato se ilustra en la Figura 3.

Ensayo para la actividad de anticuerpos. El anticuerpo quimérico derivado de levadura recombinante se evaluó para la actividad funcional a través de la tinción inmunohistoquímica de células que contienen el antígeno objetivo. El anticuerpo quimérico reconoce selectivamente el complejo CD3 encontrado en las células T. Se emplearon células Jurkat T como fuente de antígeno y de la superficie celular de tinción se llevó a cabo utilizando procedimientos descritos en Andersson y Sander (Immunol Lett. 1989 Jan 31;20(2):115-20) o Andersson y otros, (Eur J Immunol. 1988 Dec;18(12):2081-4). Las células T Jurkat se inmovilizaron en portaobjetos de vidrio, se bloquearon con el suero de bloqueo apropiado y se tiñeron con anticuerpo primario recombinante generado de mamífero y levadura durante 1 hora. Las muestras inmovilizadas se trataron después con agente de bloqueo de peroxidasa seguido de tinción con un anticuerpo secundario selectivo para Fc biotinilado que es específico para cada forma de anticuerpo (anti-ratón para el de mamífero y anti-humano para la levadura). La detección se realizó mediante el uso de un sistema de HRP-estreptavidina. La obtención de la imagen digital se realizó para recopilar los datos para cada muestra teñida. Se detecta la señal positiva en las muestras a través de una tinción oscura de las células observadas en los paneles para OKT-3 derivado de mamíferos y derivado de levadura. Estos datos se muestran en la Figura 4.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cregg, James M.
Latham, John
Litton, Mark
Schatzman, Randall
Tolstorukov, Ilya

<120> Métodos para sintetizar polipéptidos heteromultiméricos en levadura con el uso de una estrategia de apareamiento haploide

<130> P12306.EP-DIV

<140> 04796313.7
<141> 2004-10-22

<150> 60/513,876
<151> 2003-10-22

<160> 16

<170> FastSEQ para versión de windows 4.0

<210> 1
<211> 47
<212> ADN
<213> ratón

<400> 1
ccgctcgaga aaagagaggc tgaagctcag gtccagctgc agcagtc 47

<210> 2
<211> 41
<212> ADN
<213> ratón

<400> 2
tgggcccttg gtggaggctg aggagactgt gagagtggtg c 41

<210> 3
<211> 50
<212> ADN
<213> ratón

<400> 3
ccgctcgaga aaagagaggc tgaagctcaa attgttctca cccagtctcc 50

<210> 4
<211> 44
<212> ADN
<213> ratón

<400> 4
gacagatggt gcagccacag cccggtttat ttccaacttt gtcc 44

<210> 5
<211> 38
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
ataagaatgc ggccgctcat ttacccggag acagggag 38

<210> 6
<211> 41

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
gcaccactct cacagtctcc tcagcctcca ccaagggccc a 41

<210> 7
<211> 32
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
tgcggccgct catgggcacg gtgggcatgt gt 32

<210> 8
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
ataagaatgc ggccgctaac actctcccct gttgaagct 39

<210> 9
<211> 44
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9
ggacaaagtt ggaaataaac cgggctgtgg ctgcaccatc tgtc 44

<210> 10
<211>212
<212>PRT
<213> Homo sapiens

<400>10

```
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 1               5                  10                  15
Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
            20                  25                  30
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
        35                  40                  45
Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp
65                  70                  75                  80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe
                85                  90                  95
Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Val Ala Ala Pro Ser
            100                 105                 110
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
        115                 120                 125
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
    130                 135                 140
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145                 150                 155                 160
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
                165                 170                 175
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
            180                 185                 190
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
        195                 200                 205
Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210>11
<211>321
<212>ADN
<213> ratón

<400>11

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac 180
ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg 300
acaaagttgg aaataaaccg g 321

<210> 12
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12
gctgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgtta g 321

<210> 13
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

```
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
```

<210> 14
<211> 1350
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14

```
caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtggtta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ctccatcccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga                                  1350
```

<210> 15
<211> 1350
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15

```
caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtggtta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
```

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
gcctaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 16
<211> 699
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtggtta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccatga 699

Reivindicaciones

1. Un método para la síntesis y la recuperación, a partir de una levadura *Pichia pastoris,* de una proteína de inmunoglobulina heteromultimérica secretada, biológicamente activa, heteróloga (no es de levadura) que se compone de al menos dos cadenas de polipéptidos de subunidades no idénticas; el método se caracteriza por las siguientes etapas:

   (i) producir una célula o células estables diploides de levadura *Pichia pastoris* mediante apareamiento o fusión de esferoplastos de células haploides de levadura *Pichia pastoris* en condiciones de manera que dichos eventos de apareamiento o fusión de esferoplastos resulten en la producción de una célula o células diploides de levadura *Pichia pastoris*, en donde dicha célula o células diploides de levadura *Pichia pastoris* después de dicho apareamiento o fusión comprenden constructos de expresión que proporcionan la expresión y secreción de al menos dos cadenas polipeptídicas no idénticas que constituyen dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica completa, y cuyas células estables diploides de levadura *Pichia pastoris* son capaces del ensamblaje y expresión y secreción prolongadas de dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica completa en un medio de cultivo que contiene dicha(s) célula(s) de *Pichia pastoris* cuando dicha célula o células diploides de *Pichia pastoris* se cultivan bajo condiciones de cultivo adecuadas;
   (ii) después de efectuar dicho apareamiento o fusión de esferoplastos, identificar y aislar la célula o células diploides de *Pichia pastoris* que contienen constructos de expresión que proporcionan la expresión y secreción estables de al menos dos cadenas polipeptídicas no idénticas que constituyen dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica completa cuando dicha célula o células diploides de levadura *Pichia pastoris* se cultivan bajo condiciones de cultivo adecuadas;
   (iii) cultivar dicha célula o células diploides de *Pichia pastoris* o su progenie diploide en un medio de cultivo bajo condiciones que resulten en la expresión, ensamblaje y secreción de dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica biológicamente activa en el medio de cultivo; y
   (iv) recuperar la proteína heteromultimérica resultante del medio de cultivo;

   en donde dicho apareamiento o fusión de esferoplastos se efectúa mediante el apareamiento o la fusión de una primera célula haploide de levadura *Pichia pastoris* que contiene un primer constructo de expresión, dicho primer constructo de expresión contiene secuencias de ácidos nucleicos que codifican para la expresión de al menos una subunidad de dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica completa (intacta), unidas operativamente a un primer promotor de levadura; y una segunda célula haploide de *Pichia pastoris* que contiene un segundo constructo de expresión, dicho segundo constructo de expresión comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican para la(s) subunidad(es) restante(s) de dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica, unidas operativamente a un segundo promotor de levadura.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la proteína de inmunoglobulina heteromultimérica es un anticuerpo quimérico o humanizado.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos constructos genéticos se integran en el genoma de dichas células de levadura *Pichia pastoris*.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos constructos genéticos están contenidos en el elemento extracromosómico (plásmido).

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el primero o segundo de los promotores son constitutivos.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el primero o segundo de los promotores son inducibles.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células diploides de levadura *Pichia pastoris* se cultivan en un medio de producción.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7 en donde dicho medio de producción es un medio mínimo que carece de agentes selectivos tales como aminoácidos preformados u otras biomoléculas complejas.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichas células diploides de levadura *Pichia pastoris* se cultivan a una alta densidad celular.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 en donde dicha alta densidad celular es de al menos 50, 100, 300, 400 o 500 g/L.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichas células diploides de levadura *Pichia pastoris* se cultivan bajo condiciones que resultan en niveles de dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica biológicamente activa que son al menos 50, 100, 500 o 1000 mg/L.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células diploides de levadura *Pichia pastoris* se cultivan durante al menos 20, 50 o 100 duplicaciones y mantienen altos niveles de expresión de dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica después de dichas al menos 20, 50 o 100 duplicaciones y en donde después de dicha al menos 20, 50 o 100 duplicaciones, al menos el 99 % de dichas células diploides de *Pichia pastoris* comprenden dichos constructos de expresión que proporcionan la expresión de dichas cadenas que constituyen dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células diploides de levadura *Pichia pastoris* se cultivan durante al menos 20, 50 o 100 duplicaciones y después de dichas al menos 20, 50 o 100 duplicaciones expresan la proteína de inmunoglobulina heteromultimérica en un nivel de expresión que se reduce por no más de 20 %, 10 % o 5 % con relación al nivel inicial de expresión.

14. Un medio de cultivo que contiene un cultivo estable de *levadura Pichia pastoris* diploide de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el medio de cultivo comprende los niveles de expresión de dicha proteína de inmunoglobulina heteromultimérica biológicamente activa que son al menos aproximadamente 50 mg/litro, 100 mg/litro, 500 mg/litro o 1000 mg/litro o más y en donde la densidad celular de dichas células diploides de *Pichia pastoris* en dicho cultivo son de al menos aproximadamente 50 g/L, 100 g/L, 300 g/L, 400 g/L, 500 g/L o más.

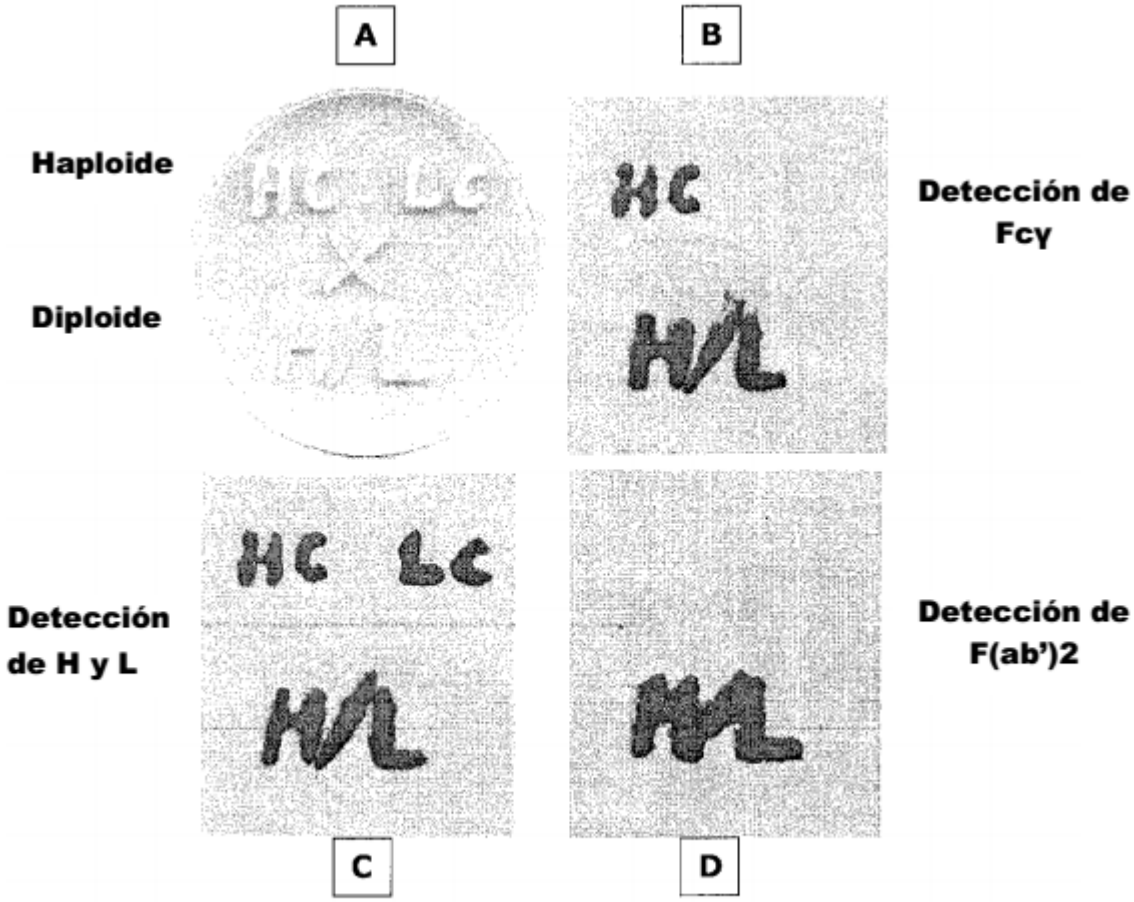

A
B
Haploide
Diploide
HC LC
H/L
HC
H/L
Detección de Fcγ
Detección de H y L
HC LC
H/L
H/L
Detección de F(ab')2
C
D

FIGURA 1

FIGURA 2

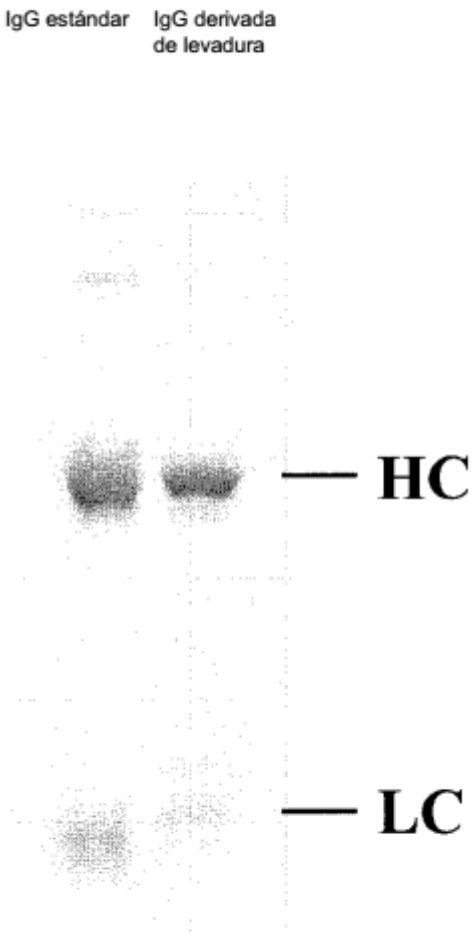
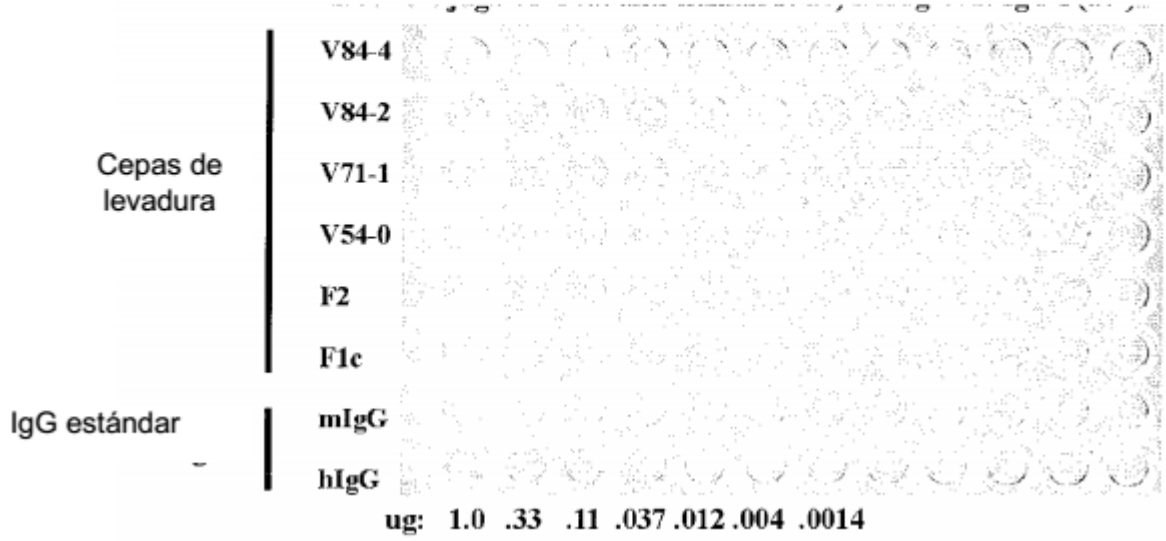


FIGURA 3


Cepas de levadura
V84-4
V84-2
V71-1
V54-0
F2
F1c
IgG estándar
mIgG
hIgG
ug: 1.0 .33 .11 .037 .012 .004 .0014

OKT-3 derivado de mamífero
OKT-3 derivado de levadura
Control de fondo

FIGURA 4