

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 716**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C07K 14/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2015 PCT/EP2015/002125**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16066260**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2015 E 15788326 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3212787**

54 Título: **Métodos de despliegue de proteínas que contienen dominios Fc no covalentes sobre la superficie de células y métodos de selección de las mismas**

30 Prioridad:

28.10.2014 EP 14003649

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2020

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
 Frankfurter Strasse 250
 64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**RHIEL, LAURA;
 BECKER, STEFAN;
 GUENTHER, RALF;
 HOCK, BJOERN;
 HELMAN, DANIEL;
 TOISTER-ACHITUV, MIRA y
 KRAH, SIMON**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 749 716 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de despliegue de proteínas que contienen dominios Fc no covalentes sobre la superficie de células y métodos de selección de las mismas.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al despliegue de proteínas como anticuerpos monoclonales sobre la superficie de células huésped y métodos para la selección de las mismas. En particular, la presente invención se refiere a la selección de anticuerpos o bibliotecas de anticuerpos o proteínas de fusión que contienen dominios Fc desplegadas sobre la superficie de células huésped y métodos para la identificación y selección de proteínas que contienen dominios Fc del fenotipo deseado. Los métodos de la invención son especialmente útiles para el cribado de bibliotecas de inmunoglobulinas en células huésped eucariotas que expresan una inmunoglobulina y fragmentos de la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se utilizan grandes cantidades de recursos a nivel académico y en la industria farmacéutica en el descubrimiento y desarrollo de anticuerpos monoclonales para terapias dirigidas. Entre las tecnologías desarrolladas disponibles hasta el momento, las técnicas de alto rendimiento para el cribado de bibliotecas de anticuerpos han permitido la identificación de nuevas moléculas candidatas y la rápida optimización de los ligantes preseleccionados mediante maduración de la afinidad.

Puesto que la identificación de nuevas moléculas candidatas está impulsada en gran medida por la tecnología, la invención de nuevas y potentes tecnologías de cribado ha demostrado ser una parte fundamental en una estrategia general para acelerar aún más el proceso de descubrimiento y desarrollo de anticuerpos. Han surgido diversas tecnologías de despliegue *in vitro* desde la aparición de las tecnologías de despliegue de fagos a mediados de los años 80 y su aplicación al despliegue de anticuerpos. Además del despliegue de fagos, existen cuatro tecnologías de despliegue principales referidas al despliegue celular, despliegue ribosómico, despliegue de ARNm y despliegue de ADN, siendo el despliegue de fagos la más establecida.

El despliegue de fagos es en la actualidad el método más extendido para el despliegue y selección de grandes conjuntos de anticuerpos y la manipulación genética adicional de anticuerpos seleccionados. Normalmente los anticuerpos se despliegan en lo que se conoce como el formato «monovalente», en el que el gen de fusión anticuerpo-proteína de recubrimiento se transporta en un vector fagémido y el despliegue se realiza mediante infección de la bacteria portadora del fagémido con un fago auxiliar. Este formato, también conocido como el formato 3 x 3, es el preferido principalmente debido a que la construcción de bibliotecas en vectores fagémidos ofrece una mayor eficiencia de transformación de los vectores fagémidos en comparación con los vectores de fagos, ya que proporciona la selección de los ligantes de mayor afinidad, que no están sesgados por efectos de avidez (Saggy y cols. [2012] Protein Eng. Des. Sel. 25, 539-549).

Entre las aplicaciones más exitosas del despliegue de anticuerpos en fagos se incluyen por ejemplo el aislamiento *de novo* de anticuerpos humanos de alta afinidad a partir de bibliotecas no inmunes y sintéticas, que incluye anticuerpos frente a autoantígenos, la generación de anticuerpos de alta afinidad con afinidad picomolar mediante maduración de la afinidad *in vitro* y el descubrimiento de anticuerpos con propiedades exclusivas a partir de bibliotecas no inmunes e inmunes de donantes animales y humanos (Hogenboom [2005] Nat. Biotech 23, 1105-1116).

A pesar de las ventajas del despliegue de anticuerpos en fagos, esta tecnología también presenta desventajas que limitan su uso: En *E. coli*, la secreción eficaz de fragmentos de anticuerpo funcionales en el espacio periplásmico típicamente requiere la expresión conjunta de chaperonas e isomerasas para evitar un mal plegamiento y la agregación de fragmentos de anticuerpo debido a la capacidad de secreción limitada (Bothmann y Plütckthun [2000], J. Biol. Chem. Vol. 275 [22], 17100-17105). Además, parece haber una selección biológica contra un número impar de cisteínas, series de cargas positivas y determinados restos en posiciones fijas dentro del péptido desplegado, lo que tiene como consecuencia una selección de fragmentos de anticuerpos inherentemente sesgada.

La segunda tecnología utilizada con mayor frecuencia es el despliegue de levaduras, que es una tecnología sólida para seleccionar y modificar por ingeniería genética fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas combinatorias. Las tecnologías de despliegue de levaduras presentan ventajas para la expresión de moléculas oligoméricas, como por ejemplo, las inmunoglobulinas IgG de longitud completa, ya que los anticuerpos tienen que pasar la vía de secreción eucariota en comparación con los anticuerpos expresados en bacterias, lo que tiene como resultado un número total mayor de inmunoglobulinas plegadas correctamente.

El despliegue de levaduras utiliza la presencia de varias proteínas naturales de anclaje a la pared celular que pueden utilizarse para dirigir proteínas heterólogas hacia la superficie celular más externa mediante la unión de una señal de unión glucosilfosfatidilinositol C-terminal denominada normalmente anclaje GPI. Inicialmente, el despliegue de levaduras se basa en la fusión genética de secuencias de ADN que codifican anticuerpos dentro del marco de lectura con la secuencia de una manoproteína de la pared celular de levaduras (Doerner y cols. [2014], FEBS Letters 588, 278-287). El repertorio de proteínas, que se utilizan para el despliegue en superficie se expandió y ahora incluye, por ejemplo aglutinina-a, Flo1p y aglutinina- α . Entre estos, el sistema que utiliza la aglutinina-a es el que se utiliza con mayor frecuencia.

La aglutinina-a es una de las dos aglutininas específicas de tipo de apareamiento que median en el contacto entre células durante el apareamiento de células de levadura apropiadas. Está formada por una subunidad central Aga1p, que se une a una subunidad de unión más pequeña Aga2p a través de dos puentes disulfuro. Debido a la señal de unión GPI de Aga1p la subunidad central ancla covalentemente el complejo Aga a la pared celular. La estructura modular de la aglutinina-a permite además la fusión de la proteína heteróloga que se va a desplegar en los extremos C o N-terminales de Aga2p en comparación con las proteínas ancladas a GPI de unidad sencilla que solo permiten la fusión N-terminal de proteínas heterólogas, debido a la señal de unión GPI C-terminal requerida. Los sistemas basados en Flo1p difieren en que pueden unir e inmovilizar proteínas heterólogas no covalentemente mediante la fusión al dominio funcional de floculación N-terminal que se cree se une a unidades de hidrato de carbono en la superficie celular.

La sobreexpresión de AGA1 codificada a nivel cromosómico y de las proteínas de fusión AGA2 codificadas a nivel del episoma está dirigida típicamente por el promotor Gal10 inducible, lo que explica los niveles de expresión estequiométrica de ambas subunidades que se asocian en el retículo endoplásmico. La expresión inducida por galactosa da lugar al despliegue de aproximadamente 10^4 - 10^5 copias de la proteína de fusión sobre la superficie de una célula huésped (Doerner y cols. [2014], FEBS Letters 588, 278-287, Boder y Wittrup [1997] Nat. Biotechnol. 15, 553-557). La detección de proteínas de fusión expuestas en la superficie se produce en virtud de etiquetas epítopo o por medio de su actividad, que en el caso de un anticuerpo es su afinidad de unión a un antígeno soluble. La detección se lleva a cabo típicamente con el antígeno respectivo biotinilado y un reactivo secundario como fluoróforos conjugados a estreptavidina, o un antígeno marcado de cualquier otro modo. En el documento WO2014/106527 A1 se describe un método para la producción de anticuerpos secretables mediante su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* y el despliegue en superficie no covalente utilizando aga1p/aga2p.

El uso de estreptavidina y proteína A para la captura y despliegue de moléculas se ha descrito en la técnica previa, por ejemplo, en el documento WO 97/19957 A1 y en Ohno y cols. (1996) Biochemical and Molecular Medicine Vol. 58, 227-233 se describen sistemas de administración de compuestos usando proteínas de fusión de estreptavidina-proteína A. En el documento US 5 328 985 se describen proteínas quiméricas recombinantes de estreptavidina-proteína A que permiten la conjugación de moléculas de anticuerpo con materiales biológicos. En Sano y cols. Biotechnology (1991) Vol. 9, 1378-1381 se describe una quimera de estreptavidina-proteína A que permite la producción en una etapa de diversos conjugados de anticuerpo específicos.

En un método se modificó el despliegue de levaduras, lo que se conoce como despliegue de secreción y captura en la superficie celular, para la selección de proteínas de unión a diana (SECANT™, Rakestraw y cols. [2011] Protein Eng Des Sel. Jun;24[6]:525-30). Esta tecnología se utilizó con éxito para desplegar anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) de longitud completa sobre la superficie de las células de levadura. En la tecnología SECANT™ la proteína de interés (PDI) se fusiona genéticamente al péptido aceptor de biotina (*biotin acceptor peptide*, BAP) pequeño seguido de un sitio de escisión de la proteasa TEV para facilitar su purificación. El péptido TEV-BAP puede fusionarse al extremo N o C-terminal de la PDI. En el extremo de la PDI opuesto a la etiqueta TEV-BAP, la PDI se fusiona genéticamente a una etiqueta, que típicamente es una etiqueta FLAG, por lo cual, el gen completo de BAP, PDI y etiqueta FLAG se localiza en posición 3' con respecto a una señal secretora de levadura, típicamente la secuencia líder genéticamente modificada de aMFpp8, la secuencia líder de la invertasa o una secuencia líder sintética, la cual va seguida de un sitio de escisión proteolítico Kex2 (Rakestraw y cols. [2011] Protein Eng Des Sel. Jun;24[6]:525-30). Para la selección de una PDI, el gen de la PDI se expresa como una fusión N o C-terminal con un BAP, que se expresa conjuntamente con ligasa biotina BirA y chaperonas. La biotina ligasa BirA biotinila la etiqueta BAP de la PDI. Tras la secreción, la PDI se une a la avidina localizada en superficie y puede marcarse con anticuerpos anti-epítopo marcados con fluoróforo o un antígeno marcado con fluoróforo para sus posteriores detección y selección.

Aunque la tecnología SECANT permite la secreción y la selección de moléculas complejas como inmunoglobulinas IgG, esta tecnología sigue requiriendo la modificación genética de una PDI y la coexpresión de una biotina ligasa, lo que añade etapas adicionales a los procedimientos de cribado y selección.

Además de la continua demanda de despliegue de levaduras y, en particular, de despliegue de moléculas complejas y su uso en la identificación y maduración de anticuerpos, también existe una continua necesidad de reducción de los costes y del tiempo asociado con el proceso de selección para identificar nuevos candidatos a anticuerpos.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método que permita el despliegue de moléculas complejas sobre la superficie de células huésped para la identificación de una proteína de interés, sin la necesidad de proteínas de anclaje codificadas genéticamente o la modificación intracelular de anticuerpos.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente un método para desplegar, detectar y seleccionar proteínas de interés del fenotipo deseado sobre la superficie de células huésped, en el que el método de la invención no requiere modificación genética de la proteína de interés.

En una primera realización, la presente invención proporciona un método para el despliegue sobre la superficie de una célula huésped, en el que el método comprende las siguientes etapas:

- 10 (a) Introducir en una célula huésped al menos uno o más polinucleótidos que codifican una proteína de interés que se quiera desplegar sobre la superficie de dicha célula huésped;
- (b) Poner en contacto la superficie de dicha célula huésped con una primera etiqueta;
- (c) Poner en contacto la superficie de dicha célula huésped de (b) con una segunda etiqueta, donde la segunda etiqueta se une específicamente y no de forma covalente a dicha primera etiqueta y a dicha proteína de interés codificada por dichos al menos uno o más polinucleótidos;
- 15 (d) Expresar dichos al menos uno o más polinucleótidos en dicha célula huésped en condiciones suficientes para la secreción de dicha proteína de interés codificada por el al menos uno o más polinucleótidos;
- (e) Poner en contacto dichas células huésped de la etapa (d) con medios para detectar específicamente dicha proteína de interés unida no covalentemente mediante dicha segunda etiqueta y detectar las células huésped que despliegan la proteína de interés en su superficie.
- 20

Según una realización de la invención, la proteína codificada por el al menos uno o más polinucleótidos es un monómero o un multímero.

Según una realización de la invención, la proteína codificada por el al menos uno o más polinucleótidos comprende un péptido señal.

25 En otra realización, la primera etiqueta utilizada en el método de la invención se une covalentemente a la superficie de la célula huésped.

Según una realización, la primera etiqueta utilizada en el método de la invención es biotina o un derivado de biotina.

En otra realización, la segunda etiqueta utilizada en el método de la invención es una proteína adicional o un polipéptido adicional.

30 En una realización, la proteína adicional o el péptido adicional que es la segunda etiqueta del método de la invención es una proteína multimérica.

En una realización, la segunda etiqueta del método de la invención es o comprende uno de entre proteína A, proteína L, proteína G, fusión de proteínas A-G, dominios E, D, A, B de la proteína A, fusionados con la avidina, estreptavidina o sus variantes de secuencia.

35 Según una realización, la célula huésped del método de la invención se selecciona entre células de mamífero, levadura o insecto como se describe en este documento.

En una realización, los medios para la detección específica de dicha proteína de interés en el método de la invención se seleccionan a partir del grupo que comprende anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, puntos cuánticos, enzimas, fluoróforos o colorantes intercalantes, y gangliósidos.

40 En una realización, los medios para la detección específica de dicha proteína de interés en el método de la invención pueden ser uno de entre un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, scFv-Fc, scFv, (Fab')₂, Fab, minianticuerpo, dianticuerpo o anticuerpo VHH; todos los cuales pueden estar acoplados opcionalmente a una etiqueta adicional.

En una realización, el método de la invención como se describe anteriormente comprende además la etapa de seleccionar las células huésped, por ejemplo, las células detectadas en la etapa (d) del método de la invención.

Según una realización, las células huésped seleccionadas en el método de la invención como se describe anteriormente despliegan una proteína de interés de fenotipo alterado.

- 5 Según una realización, el fenotipo alterado de la proteína de interés según la invención es uno de nivel de expresión en superficie, estabilidad de la proteína, plegamiento de proteínas o afinidad.

En una realización, el fenotipo alterado de la proteína de interés en el método de la invención se determina comparando dichas células huésped de la etapa (e) del método de la invención con una muestra de referencia.

- 10 En una realización, la proteína codificada por el al menos uno o más polinucleótidos de la etapa (a) del método de la invención comprende al menos un dominio Fc como se describe en este documento.

En una realización preferida, el al menos un dominio Fc según la invención como se describe anteriormente es uno de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia.

En una realización preferida, la proteína que contiene el dominio Fc según la invención es una proteína de fusión del dominio Fc N-terminal, proteína de fusión del dominio Fc C-terminal o un anticuerpo.

- 15 En una realización preferida, el anticuerpo codificado por los polinucleótidos de la etapa (a) del método de la invención es un anticuerpo monoclonal, preferiblemente el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano, un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano.

- 20 Según una realización, la segunda etiqueta del método de la invención se une específicamente a los dominios Fc de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina.

En una realización, la segunda etiqueta del método de la invención como se describe anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1 y/o la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2.

En una realización, la segunda etiqueta del método de la invención comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 3.

- 25 En una realización preferida, la etapa (e) del método de la invención como se describe anteriormente comprende además:

- (i) poner en contacto dicha célula huésped con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo detectablemente marcado, que se une específicamente a los dominios Fc de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia;
- 30 (ii) poner en contacto la célula huésped con un antígeno y/o epítipo del anticuerpo unido a la segunda etiqueta, que está acoplada a una etiqueta detectable adicional distinta de la etiqueta utilizada en (i);
- (iii) detectar las etiquetas de (i) y/o (ii) sobre dichas células huésped;
- (iv) seleccionar células huésped que desplieguen cantidades alteradas de la etiqueta utilizada en (i), y/o la etiqueta utilizada en (ii) y/o que desplieguen cantidades alteradas de ambas etiquetas en comparación
35 con una muestra de referencia.

En una realización preferida el anticuerpo o fragmento de anticuerpo detectablemente marcado de la etapa (e) (i) según la invención se une específicamente a las cadenas ligeras kappa o lambda de IgG1 humana o murina, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia.

- 40 En una realización preferida, las etiquetas de (i) y (ii) y/o la etapa de selección (iv) del método de la invención comprenden citometría de flujo y/o FACS y/o tecnología de microfluidos.

Según una realización, pueden repetirse las etapas (a)-(e) del método de la invención como se describe en este documento.

En una realización, la célula huésped utilizada en el método de la invención es una célula de levadura y la etapa (a) del método de la invención comprende además el apareamiento de al menos una primera y una segunda células de

levadura, en el que dicha primera y segunda células huésped comprenden polinucleótidos diferentes de los que al menos uno codifica una proteína de fusión que contiene un dominio Fc y en el que dichos polinucleótidos de dichas primera y segunda células huésped comprenden al menos un marcador seleccionable diferente.

5 En una realización, dicha primera célula de levadura utilizada en el método de la invención anterior comprende polinucleótidos que codifican cadenas ligeras de inmunoglobulina y/o en el que dicha segunda célula de levadura utilizada en el método de la invención comprende polinucleótidos que codifican cadenas pesadas de inmunoglobulina.

10 En una realización del método de la invención, dicha primera célula de levadura comprende polinucleótidos que codifican una biblioteca de cadenas ligeras de inmunoglobulina y en el que dicha segunda célula de levadura comprende polinucleótidos que codifican cadenas pesadas de inmunoglobulina de afinidad predeterminada por la proteína de interés.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 Figura 1: (A) Análisis en gel con azul de Coomassie que muestra el tetrámero SA-ZZ (pocillo 4) y el monómero nativo y el tetrámero (pocillo 3). (B) Análisis por inmunotransferencia que muestra SA-ZZ unido a IgG (izquierda) y la proteína biotinilada (derecha). El tamaño aparente del monómero es de 31 kDa (pocillo 3) y el del tetrámero es de 91 kDa (pocillo 2).

Figura 2: Análisis con el sistema Octet para la unión de SA-ZZ a una IgG capturada sobre los extremos de captura anti-Fc humano (extremos AHC) (izquierda) y de SA-ZZ a HRP biotinilada capturada en los extremos de estreptavidina (derecha).

20 Figura 3: Ilustración esquemática de células huésped modificadas mediante REAL-Select con el propósito de despliegue en la superficie celular de anticuerpos endógenos. Las células huésped portadoras de plásmidos que codifican un anticuerpo se biotinilan en primer lugar mediante el uso de un reactivo de biotinilación comercial (A). Esta modificación va seguida del marcaje de las células con la proteína de fusión recombinante estreptavidina-ZZ (SA-ZZ) (B), que permite la recaptura de anticuerpos secretados en la superficie celular (C).

30 Figura 4: Valoración de los reactivos para el marcaje con biotina y la inmovilización de SA-ZZ sobre las células de levadura. Las respectivas señales fluorescentes indirectas se analizaron mediante citometría de flujo. (A) Se marcaron 1×10^7 células con 1 mg a 6 mg de reactivo de biotina y se tiñeron con estreptavidina-Dylight633. (B) Se incubaron 1×10^7 células marcadas con 1 mg de biotina con 2, 3 o 4 μ g de SA-ZZ para la inmovilización del resto de captura de Fc. Posteriormente el dominio ZZ en la superficie se detectó usando un anticuerpo de cabra anti-proteína A conjugado con FITC.

35 Figura 5: Fenotipo de células de levadura funcionalizadas con REAL-Select de tres anticuerpos monoclonales (AcMos) diferentes analizados mediante citometría de flujo. (A) Anti-cMet-B10, (B) adalimumab, (C) matuzumab y los respectivos controles sin (D) cMet, (E) TNF α , (F) EGFR. El despliegue de anticuerpos funcionales se detectó usando el correspondiente anticuerpo marcado con fluorescencia (tabla 1) y un anticuerpo de detección de Fc específicos (despliegue de IgG).

40 Figura 6: Análisis por citometría de flujo de la saturación del dominio de captura de células de levadura funcionalizadas con REAL-Select. (A) Células recubiertas de SA-ZZ portadoras de plásmidos para las cadenas ligera y pesada de matuzumab, (B) captura en superficie de matuzumab (anticuerpo azul) o golimumab añadido externamente (anticuerpo rojo). (C-E) Análisis de células de levadura recubiertas con la proteína de fusión SA-ZZ con anticuerpo de cabra antiproteína A conjugado con FITC 0, 6 y 20 horas después de recubrir la superficie y de inducir la expresión de matuzumab. (F-H) Detección de dominios de captura de Fc no ocupados mediante incubación de las células con golimumab seguido de marcaje con TNF α -Dylight650 en puntos temporales indicados. (I, J) Control del despliegue en superficie de matuzumab recapturado mediante el marcaje de las células con F(ab') $_2$ de cabra anti-Fc conjugado con AlexaFluor647 a las 6 y 20 horas de expresión.

50 Figura 7: Análisis por FACS de enriquecimiento REAL-Select de células que despliegan matuzumab. Las células de levadura funcionalizadas que despliegan (A) matuzumab o (B) trastuzumab se mezclaron en una relación 1:1 000 000 (C) y se marcaron usando EGFR-PE y F(ab') $_2$ de cabra anti-Fc conjugado con AlexaFluor647. (C-F) Las células que despliegan matuzumab se enriquecieron mediante FACS durante cuatro rondas consecutivas de clasificación.

Figura 8: Fenotipo de células de levadura de la biblioteca de CDR-H3 y estrategia de selección para la maduración de afinidad de un anticuerpo específico de cMet durante tres rondas de cribado mediante

FACS con concentraciones decrecientes de antígeno cMet (B) 250 nM, (D) 62 nM, (F) 15 nM y anti-Fc conjugado con AlexaFluor647 para la detección del despliegue. Como control específico para cada ronda de clasificación, se indujo la secreción de IgG en las células de la biblioteca enriquecidas y se marcaron solo con un anticuerpo anti-Fc conjugado con AlexaFluor647 (A, C, E).

5 Figura 9: Caracterización funcional de un anticuerpo con mejora de la unión de cMet. (A, B) Análisis por FACS de (A) células de levadura que despliegan el anticuerpo parental, (B) células que despliegan el anticuerpo
10 seleccionado marcado con cMet-PE 100 nM y anti-Fc conjugado con AlexaFluor647. (C) Cinéticas de unión del anticuerpo parental expresado en Expi293 y (D) variante del anticuerpo de afinidad madurada frente a cMet (100 nM, 50 nM, 10 nM) determinado mediante interferometría de biocapa. Las constantes de velocidad de asociación (kon), constantes de velocidad de disociación (kdis) y afinidades de unión (KD) de ambos anticuerpos se determinaron asumiendo un modelo de unión 1:1.

Figura 10: REAL-Select es compatible con otros huéspedes de expresión distintos a *S. cerevisiae*, el despliegue de moléculas de IgG de longitud completa en células Expi293F™ como ejemplo de huéspedes de expresión mamíferos se examinó utilizando la nueva tecnología.

15 Figura 11: REAL-Select usando anticuerpos anticadena ligera para marcaje de anticuerpos desplegados en superficie (véase el ejemplo 12). (A) Presentación esquemática del marcaje de la cadena ligera (panel izquierdo). La expresión en la superficie celular de anticuerpos intactos se correlaciona con la intensidad de tinción, como se muestra en el panel derecho. (B) La viabilidad del marcaje de la cadena ligera se evaluó en dos clones de anticuerpos independientes que reconocen el antígeno A y el antígeno B.

20 Figura 12: Se muestran los resultados de clasificación de un experimento de enriquecimiento clonal como se describe en el ejemplo 13. Los resultados indican una especificidad de unión por el antígeno Y conjugado con Alexa 647, mostrando que el clon de anticuerpo correcto se había enriquecido con éxito con respecto a la mezcla original en el que el clon enriquecido estaba inicialmente en una dilución 1:10⁶.

25 Figura 13: Uso de REAL Select en la maduración de la afinidad. Se representan los resultados de tres rondas de maduración de la afinidad y selección mediante «barajado» de cadenas ligeras como se describe en el ejemplo 14. (A) análisis por FACS de clones enriquecidos, entre los cuales se seleccionaron aquellos que estaban dentro de los parámetros de selección para su posterior clasificación. (B) Análisis mediante Biacore™ de un clon de anticuerpo de afinidad madurada tras tres rondas de selección y enriquecimiento consecutivos.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N.º 1	Secuencia de aminoácidos del dominio de unión al dominio Fc (ZZ) comprendido en la segunda etiqueta
SEC ID N.º 2	Secuencia de aminoácidos de estreptavidina (SA) comprendido en la segunda etiqueta
SEC ID N.º 3	Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SA-ZZ
35 SEC ID N.º 4	Secuencia de aminoácidos del péptido señal
SEC ID N.º 5	Secuencia de nucleótidos de la segunda etiqueta
SEC ID N.º 6	Secuencia de aminoácidos de la segunda etiqueta de la invención que incluye la secuencia señal
SEC ID N.º 7	Cebador utilizado en la generación de la biblioteca
SEC ID N.º 8	Cebador utilizado en la generación de la biblioteca
40 SEC ID N.º 9	Secuencia líder artificial
SEC ID N.º 10	Secuencia líder artificial
SEC ID N.º 11	Secuencia líder artificial
SEC ID N.º 12	Secuencia líder artificial
SEC ID N.º 13	Secuencia líder artificial

	SEC ID N.º 14	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 15	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 16	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 17	Secuencia líder artificial
5	SEC ID N.º 18	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 19	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 20	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 21	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 22	Secuencia líder artificial
10	SEC ID N.º 23	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 24	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 25	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 26	Secuencia líder artificial
	SEC ID N.º 27	Secuencia líder artificial
15	SEC ID N.º 28	Secuencia líder artificial

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos en particular descritos en este documento ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito únicamente de describir realizaciones en particular y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia.

A continuación se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. No debe interpretarse que los ejemplos y las realizaciones preferidas descritos de modo diverso limitan la presente invención solo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción apoya y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferidos. Asimismo, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse revelada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique otra cosa.

A través de esta especificación y las reivindicaciones que le siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que el término «comprender», y variaciones como «comprende» y «comprendiendo», implica la inclusión de un miembro especificado, entero o en fases, pero no la exclusión de cualquier otro miembro no especificado, entero o en fases. El término «constar de» es una realización particular del término «comprender», en el que se excluye cualquier otro miembro no especificado, entero o en fases. En el contexto de la presente invención, el término «comprender» abarca el término «constar de».

Se debe interpretar que los términos «un/una» y «el/la» y referencias similares usadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el plural como el singular, a menos que se indique otra cosa en este documento o lo contradiga claramente el contexto. La relación de intervalos de valores en este documento pretende simplemente servir como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor independiente que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique otra cosa en este documento, cada valor individual se incorpora dentro de la especificación como si se

enumerara individualmente en este documento. Ningún texto de la especificación debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos.

5 Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a dicha memoria descriptiva en virtud de la invención previa.

Los objetivos descritos se resuelven por la presente invención, preferiblemente por el contenido de las reivindicaciones adjuntas. Los inventores han encontrado sorprendentemente que las proteínas pueden desplegarse no covalentemente sobre la superficie de las células huésped mediante el método de la invención.

10 La presente invención se resuelve según una primera realización mediante un método de despliegue de proteínas sobre la superficie de una célula huésped, en el que el método comprende las etapas de (a) introducir al menos uno o más polinucleótidos en una célula huésped, que codifica una proteína de interés que se va a desplegar sobre la superficie de dicha célula huésped, (b) poner en contacto la superficie de dicha célula huésped con una primera etiqueta; (c) poner en contacto la superficie de dicha célula huésped de (b) con una segunda etiqueta, en el que la segunda etiqueta se une específicamente y de forma no covalente con dicha primera etiqueta y dicha proteína de interés codificada por dicho al menos uno o más polinucleótidos; (d) expresar dicha al menos uno o más polinucleótidos en dicha célula huésped en condiciones suficientes para la secreción de dicha proteína de interés codificada por al menos uno o más polinucleótidos; (e) detectar células huésped, que despliegan dicha proteína de interés de la etapa (d) unida a la segunda etiqueta sobre la superficie de dichas células huésped, (f) poner en contacto dichas células huésped de la etapa (e) con medios para detectar específicamente dicha proteína de interés unida a dicha segunda etiqueta. El término célula «huésped» según se usa en el método de la invención puede ser cualquier célula adecuada para la expresión de la proteína de interés, como por ejemplo, células de levaduras, células de insectos, células de peces o de mamíferos.

25 El término «introduciendo» según se usa con el método de la invención se referirá a cualquier método adecuado para introducir o transferir polinucleótidos en las células huésped, por ejemplo, transformación, transducción, transfección mediante cualquier tecnología conocida en la técnica. En este documento, el término «transformación» según se usa con el método de la invención se utiliza para describir la introducción de polinucleótidos, como por ejemplo, plásmidos, dentro de las células de levadura y células fúngicas, el término «transducción» según se usa para el método de la invención se refiere a la introducción vírica o transferencia vírica de polinucleótidos o material genético en células de mamíferos, peces o insectos. Puede utilizarse cualquier sistema vírico conocido para la transducción de la célula huésped de la presente invención, como por ejemplo, pueden utilizarse sistemas de adenovirus, sistemas de virus adenoasociados (AAV), sistemas retrovirales, como sistemas basados en el virus de la leucemia de Moloney (Mo-MLV) o sistemas de expresión lentivirales, o sistemas basados en el virus del herpes simple (HSV) u otros sistemas basados en virus como, por ejemplo, Epstein-Barr, Sendai, Sindbids, polioma y sarampión (véase por ejemplo, Mah y cols. [2002] Clin. Pharmacokin [12]:901-911). Si las células huésped utilizadas en el método de la invención son células de insecto, pueden usarse por ejemplo, sistemas de expresión baculovirales para introducir al menos uno o más polinucleótidos en la célula huésped; no obstante, también pueden usarse bacilovirus para introducir los polinucleótidos según la invención en la célula huésped (véase por ejemplo, Hofmann y cols. Proc Natl Acad Sci USA [1995], 92:10099-10103; Boyce FM, y cols. Proc Natl Acad Sci USA [1996], 93:2348-2352). El término «transfección» según se utiliza para el método de la invención se refiere a la captación de ácidos nucleicos por una célula huésped mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, como los métodos que se describen en Graham y cols. (1973); Sambrook y cols. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York; Davis y cols. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, especialmente coprecipitación con fosfato de calcio, microinyección directa en células en cultivo, transfección de genes mediada por ultrasonidos, electroporación, lipofección o nucleofección.

45 Por ejemplo, pueden usarse células de levadura en el método de la invención y pueden cultivarse y transformarse como se describe en Benatuil y cols. Protein Engineering, Design & Selection vol. 23 n.º 4 pág. 155-159, 2010. Por ejemplo, para obtener células de levadura electrocompetentes, puede crearse células de *S. cerevisiae* (EBY100) durante toda la noche hasta fase estacionaria (DO₆₀₀ de 3 o superior) en medio YPD (10 g/l de base de nitrógeno de levadura, 20 g/l de peptona y 20 g/l de D-(+)-glucosa) sobre un agitador de plataforma a 225 rpm y 30 °C. Posteriormente, puede inocularse, por ejemplo, una alícuota del cultivo de toda la noche a una DO₆₀₀ inicial de 0,3. Por ejemplo, a continuación, puede dejarse que las células continúen creciendo sobre un agitador de plataforma a 30 °C y 225 rpm hasta que la DO₆₀₀ sea de aproximadamente 1,6. Después, las células pueden recogerse mediante centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos y eliminar el medio de cultivo. Posteriormente, las células pueden, por ejemplo, lavarse dos veces en 50 ml de agua enfriada en hielo y una vez con 50 ml de tampón de electroporación enfriado en hielo (sorbitol 1 M/CaCl₂ 1 mM). Las células de levadura pueden acondicionarse resuspendiendo el sedimento de células en 20 ml de LiAc 0,1 M/DTT 10 mM y agitando a 225 rpm en un matraz de cultivo durante 30 minutos a 30 °C. Posteriormente, las células acondicionadas pueden recogerse mediante centrifugación, lavarse, por ejemplo, una vez en 50 ml de tampón de electroporación enfriado en hielo, por ejemplo mediante centrifugación, y resuspenderse en 100 a 200 µl de tampón de electroporación hasta alcanzar un volumen final de 1 ml, que se

corresponde con aproximadamente $1,6 \times 10^9$ células/ml. Por ejemplo, puede utilizarse la electroporación de 400 μ l de células de levadura y mantenerse en hielo hasta la electroporación. Si se requiere, como por ejemplo para la transformación de un gran número de polinucleótidos, como por ejemplo cuando se transforman bibliotecas de anticuerpos humanos, la cantidad de células de levadura utilizadas para la electroporación puede aumentarse, por ejemplo, pueden usarse 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l, 900 μ l o 1 ml de células acondicionadas. Los polinucleótidos utilizados para la transformación (electroporación) de las células de levadura en el método de la invención deben prepararse preferiblemente de antemano. Para la electroporación de los polinucleótidos pueden utilizarse de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 μ g de polinucleótidos, por ejemplo de aproximadamente 2 μ g a aproximadamente 48 μ g, o de aproximadamente 4 μ g a aproximadamente 45 μ g, o de aproximadamente 6 μ g a aproximadamente 40 μ g, de aproximadamente 8 μ g a aproximadamente 35 μ g, de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 25 μ g, o de aproximadamente 12 μ g a aproximadamente 20 μ g, o de aproximadamente 4 μ g a aproximadamente 18 μ g, o de aproximadamente 6 μ g a aproximadamente 16 μ g, o de aproximadamente 7 μ g a aproximadamente 14 μ g, o de aproximadamente 5 μ g a aproximadamente 12 μ g, o pueden usarse para la electroporación 2 μ g, 3 μ g, 4 μ g, 5 μ g, 6 μ g, 7 μ g, 8 μ g, 9 μ g, 10 μ g, 11 μ g, 12 μ g, 13 μ g, 14 μ g, 15 μ g, 16 μ g, 17 μ g, 18 μ g, 19 μ g, 20 μ g, 21 μ g, 22 μ g, 23 μ g, 24 μ g, 25 μ g, 26 μ g, 27 μ g, 28 μ g, 29 μ g, 30 μ g, 31 μ g, 32 μ g, 33 μ g, 34 μ g, 35 μ g, 36 μ g, 37 μ g, 38 μ g, 39 μ g, 40 μ g, 41 μ g, 42 μ g, 43 μ g, 44 μ g, 45 μ g, 46 μ g, 47 μ g, 48 μ g, 49 μ g o 50 μ g de polinucleótidos. Preferiblemente, el volumen de los polinucleótidos debe ser superior a 50 μ l. A continuación, las células de levadura acondicionadas pueden, por ejemplo, mezclarse suavemente con los polinucleótidos, transferirse a una cubeta de electroporación previamente enfriada, por ejemplo, con una distancia entre electrodos de 0,2 cm e incubarse durante aproximadamente 5 minutos en hielo, tras lo cual las células de levadura pueden electroporarse, por ejemplo, a 2,5 kV y 25 μ F, donde la constante de tiempo debe estar, por ejemplo, en el intervalo de 3,0 a 4,5 milisegundos. Las células de levadura electroporadas pueden transferirse a continuación a 8 ml de mezcla 1:1 de sorbitol 1 M:medio YDP y, por ejemplo, incubarse sobre un agitador de plataforma a 225 rpm y 30 °C durante 1 hora. A continuación, las células pueden recogerse, por ejemplo, mediante centrifugación y resuspenderse en medio SD-UT (20 g/l de glucosa; 6,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos; 5,4 g/l de Na_2HPO_4 ; 8,6 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ y 5 g/l de casaminoácidos [CSM-TRP-URA]). Por ejemplo, por cada 400 μ l de células de levadura electroporadas pueden utilizarse 250 ml de medio SD-UT.

Los términos polinucleótido o ácido nucleico según se utilizan en el método de la invención generalmente se refieren a moléculas que comprenden diversos nucleótidos. Entre los ejemplos de polinucleótidos se incluyen ácidos desoxirribonucleicos, ácidos ribonucleicos y análogos sintéticos de los mismos, incluidos ácidos nucleicos peptídicos. Por ejemplo, los polinucleótidos según la presente invención pueden comprender ARN o ADN vírico que comprende al menos una, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de interés. El al menos un polinucleótido utilizado en la presente invención puede también proporcionarse como uno o más vectores de expresión (plásmidos), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más vectores de expresión, donde el término vector de expresión se refiere a un vector, o vector episomal, que generalmente es un plásmido que se utiliza para introducir y expresar un gen específico, como por ejemplo, la proteína de interés que se va a desplegar no covalentemente sobre la superficie de una célula huésped según la presente invención, en una célula diana. Los vectores de expresión permiten la producción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula, la proteína codificada por el gen se produce mediante la maquinaria celular de transcripción y traducción. El plásmido se modifica por ingeniería genética de modo que contenga un promotor muy activo que provoque la producción de grandes cantidades de ARNm. Un vector episomal es capaz de autoreplicarse de forma autónoma dentro de las células huésped. El término «proteína» que es codificada por al menos uno o más polinucleótidos que se desplegarán según el método de la invención sobre la superficie de una célula huésped, se refiere a proteínas de longitud completa, fragmentos de proteínas, proteínas en su estado nativo o proteínas desnaturalizadas. Por ejemplo, las proteínas o fragmentos de proteínas que se desplegarán sobre la superficie de una célula huésped según la invención pueden comprender de aproximadamente 50 a aproximadamente 35000 aminoácidos, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 32500 aminoácidos, o de aproximadamente 125 aminoácidos a aproximadamente 30000 aminoácidos, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 27500 aminoácidos, o de aproximadamente 200 aminoácidos a aproximadamente 27000 aminoácidos, o de aproximadamente 220 a aproximadamente 26750 aminoácidos, o de aproximadamente 250 a aproximadamente 26500 aminoácidos, o de aproximadamente 300 aminoácidos a aproximadamente 26000 aminoácidos, o de aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 260, 270, 280, 290, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 850, 900, 950, 1000 a aproximadamente 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000 aminoácidos.

El método de la invención además comprende poner en contacto la superficie de una célula huésped con una primera etiqueta, en el que el término «poner en contacto» se refiere al proceso de hacer que entren en contacto al menos dos entidades distintas, por ejemplo, al menos una célula huésped y al menos una primera etiqueta, de modo que pueda reaccionar o unirse a la superficie de la célula huésped. La primera etiqueta según la invención puede ser, por ejemplo, un azúcar, aminoácido, proteína, péptido, enzima, lípido, vitamina, ácido nucleico, ácidos nucleicos peptídicos, gangliósido o punto cuántico, proteína A, cada uno de los cuales puede por ejemplo funcionalizarse para reaccionar con la superficie de la célula huésped del método de la invención, por ejemplo, los compuestos mencionados anteriormente pueden comprender grupos reactivos como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o

éster de tetrafluorofilo (THF). El método de la invención además comprende poner en contacto la superficie de la célula huésped como se describe anteriormente con una segunda etiqueta, en el que la segunda etiqueta se une específicamente y no de forma covalente a dicha primera etiqueta y a dicha proteína de interés codificada por dicho al menos uno o más polinucleótidos. La segunda etiqueta según la invención puede por ejemplo incluir proteínas de unión a gangliósido (lectinas), pseudosustratos de enzima, enzimas, como quinasas, proteínas de fusión, que se unen a la primera etiqueta sobre la superficie de la célula huésped según la invención y son capaces de unirse a la proteína de interés, por ejemplo, la segunda etiqueta puede ser una proteína multimérica, de la cual al menos un dominio o fragmento de la proteína es capaz de unirse a la primera etiqueta, y al menos un segundo dominio que es capaz de unirse a la proteína de interés.

El método de la invención además comprende la expresión de la proteína de interés codificada por el al menos uno o más polinucleótidos en condiciones que son suficientes para la secreción de la proteína de interés. Por ejemplo, pueden cultivarse células de mamífero como se describe en Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture (Phelan, Current Protocols in Cell Biology 1.1.1-1.1.18, septiembre 2007) utilizando medios de cultivo celular como, por ejemplo, DMEM, RPMI 1640, MEM, DMEM/F12 de Ham, o medio de cultivo sin suero o sin proteínas como, por ejemplo, Expi293™ (Life Technologies) o medio Freestyle™ (Life Technologies). Por ejemplo, las células de insecto pueden cultivarse en medio TC de insecto de Grace o en medio de *Drosophila* de Scheider.

El método de la invención comprende como etapa (e) detectar células huésped que despliegan la proteína de interés como es codificada por el al menos un polinucleótido como se describe anteriormente, que se une mediante la segunda etiqueta según el método de la invención sobre la superficie de la célula huésped. El método de la invención además comprende poner en contacto la célula huésped como se describe anteriormente con medios, que específicamente detectan la proteína de interés, la cual está unida no covalentemente mediante la segunda etiqueta. «Detección» según se usa en el método de la invención se refiere a determinar cuantitativa o cualitativamente la presencia o ausencia de una célula huésped a cuya superficie está unida no covalentemente la proteína de interés mediante la segunda etiqueta, donde la segunda etiqueta se une a la primera etiqueta sobre la superficie de la célula huésped.

En una realización la proteína de interés desplegada sobre la superficie de una célula huésped puede ser una proteína monomérica o multimérica, por ejemplo, la proteína de interés puede comprender una cadena polipeptídica o puede comprender 2-22, 3-20, 4-18, 5-17, 6-16, 7-15, 8-14, 9-13, 10-12, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 subunidades, cada una de las cuales puede comprender un polipéptido o proteína que comprende varios aminoácidos como se describe anteriormente. Las cadenas polipeptídicas de la proteína multimérica pueden, por ejemplo, estar también unidas mediante puentes disulfuro, que pueden, por ejemplo, formarse entre restos de cisteína de las cadenas polipeptídicas o fragmentos de proteínas individuales. Por consiguiente, la proteína de interés puede ser, por ejemplo, una proteína multimérica, que comprende más de 35000 aminoácidos. La proteína de interés desplegada mediante el método de la invención puede ser, por ejemplo, una proteína homomérica que está compuesta por polipéptidos o proteínas idénticas, por ejemplo, la proteína de interés puede comprender 2-22, 4-18, 6-16, 8-14, 10-12, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 cadenas polipeptídicas (subunidades) idénticas, que pueden, por ejemplo, estar unidas mediante puentes disulfuro, o pueden, por ejemplo, formar un complejo multimérico mediante interacciones no covalentes, como por ejemplo, interacciones hidrófobas proteína-proteína. La magnitud del efecto hidrófobo para un determinado compuesto, como por ejemplo, la proteína de interés, puede estimarse mediante la medición de la energía de transferencia libre, ΔG_{tr} , del compuesto de la fase gaseosa, líquida o sólida al agua. Un valor positivo de ΔG_{tr} significa que la molécula prefiere un entorno no acuoso. En el caso de los aminoácidos, las mediciones pueden realizarse con el aminoácido libre o sus variantes modificadas para que estén mejor representados los aminoácidos incorporados dentro de la cadena proteica. Por ejemplo, la proteína de interés también puede ser una proteína heteromérica y comprender dos o más polipéptidos o subunidades o proteínas diferentes, por ejemplo, la proteína de interés puede comprender 2-22, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 polipéptidos o subunidades diferentes, que pueden por ejemplo estar unidos mediante puentes disulfuro, interacciones hidrófobas o unidos mediante enlazadores o enlazadores artificiales. El término «enlazador» o «enlace» según se utiliza para la proteína de interés del método de la invención se refiere a un resto de enlace que conecta dos proteínas, o polipéptidos y tiene un esqueleto molecular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de longitud. Por ejemplo, un enlazador o enlace puede ser un enlace covalente que conecta dos polipéptidos o proteínas de la proteína de interés o una cadena de entre 1 y 20 átomos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19 o 20 átomos de carbono de longitud, donde el enlazador puede ser lineal, ramificado, cíclico o un único átomo. En determinados casos, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más átomos de carbono de un esqueleto enlazador pueden estar opcionalmente sustituido por un heteroátomo de azufre, nitrógeno u oxígeno. Los enlaces entre átomos del esqueleto molecular pueden, por ejemplo, estar saturados o insaturados, donde normalmente se presentan no más de uno, dos o tres enlaces insaturados en un esqueleto enlazador. El enlazador puede incluir, por ejemplo, uno o más grupos sustituyentes, por ejemplo, un grupo alquilo, arilo o alquenilo. Un enlazador puede incluir, sin limitaciones, oligo(etilenglicol), éteres, tioéteres, amins terciarias, alquilos, que pueden ser lineales o ramificados, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletil (isopropilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletil (t-butilo) y similares. El esqueleto enlazador puede, por ejemplo, incluir un grupo cíclico, como un arilo, un heterociclo o un grupo cicloalquilo, donde 2 o más átomos, por ejemplo, 2, 3, o 4 átomos, del grupo cíclico se

incluyen en el esqueleto molecular y pueden ser escindibles o no escindibles. La proteína de interés puede ser, por ejemplo, una proteína artificial, por ejemplo, una proteína no natural y comprende, por ejemplo, fusiones de proteínas o fragmentos de proteínas naturales, o, por ejemplo, puede comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o puede comprender sustituciones, deleciones o adiciones de uno o más aminoácidos, por ejemplo, la proteína de interés artificial puede comprender 1-100, 5-90, 10-80, 15-75, 20-70, 25-65, 30-55, 35-50, 40-45, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras en comparación con proteínas o fragmentos de proteínas naturales. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos conservadora en la proteína de interés de la presente invención se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares, como por ejemplo, tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o aromaticidad, e incluye intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

<u>Grupo</u>	<u>Aminoácidos</u>
I (restos polares alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares)	Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
II (restos polares cargados negativamente)	Asp, Asn, Glu, Gln,
III (restos polares cargados positivamente)	His, Arg, Lys;
IV (restos alifáticos grandes no polares)	Met, Leu, Ile, Val, Cys
V (restos aromáticos grandes)	Phe, Tyr, Trp,

La sustitución de aminoácidos no conservadora en la proteína de interés de la presente invención incluye, por ejemplo, sustituciones entre grupos I a V diferentes como se describe anteriormente, por ejemplo, entre los grupos I y II, I y III, I y IV, I y V, II y III, II y IV, II y V, III y IV, III y V.

Según una realización, la proteína de interés de la presente invención codificada por el al menos un polinucleótido comprende un péptido señal. En este documento, la secuencia señal según se usa para la proteína de interés del método de la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos que es capaz de iniciar el paso de un polipéptido, al que se une de forma operativa, por ejemplo, mediante un enlace peptídico, al interior del retículo endoplásmico (RE) de una célula huésped. El péptido señal generalmente se escinde mediante una endopeptidasa (p. ej., una peptidasa específica de señal localizada en el RE) para liberar el polipéptido (maduro). La longitud de un péptido señal típicamente está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 aminoácidos. En una realización según se usa en este documento, la expresión «una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal» no incluye dentro de su alcance una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de longitud completa del polipéptido homólogo para el que un péptido señal inicia de forma natural el paso al retículo endoplásmico. En particular dicho péptido señal puede ser capaz de dirigir al polipéptido dentro de una ruta de secreción de la célula. Si, por ejemplo, la célula huésped de la invención es una célula de mamífero, las secuencias líder que están unidas de forma operativa a la proteína de interés según la invención pueden incluir MELGLSWIFLLAILKGVQC (SEC ID N.º 9), MELGLRWVFLVAILEGVQC (SEC ID N.º 10), MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEC ID N.º 11), MDWTWRILFLVAAATGAHS (SEC ID N.º 12), MDWTWRFLFWAAATGVQS (SEC ID N.º 13), MEFGLSWFLVAILKGVQC (SEC ID N.º 14), MEFGLSWVFLVALFRGVQC (SEC ID N.º 15), MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEC ID N.º 16), MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC (SEC ID N.º 17), MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEC ID N.º 18), MPLLLLLPLWAGALA (SEC ID N.º 19), MKVLILACLVALALA, MKWVTFISLLFLFSSAYS...RGVFR (SEC ID N.º 20),

Si, por ejemplo, se utilizan células de insecto como células huésped en el método de la invención, deben usarse secuencias señal adecuadas para las células de insecto, que por ejemplo pueden incluir MKFLVVALVFMVVYISYIYA (SEC ID N.º 28).

Si, por ejemplo, se utilizan células de levadura como células huésped en el método de la invención, deben usarse secuencias señal adecuadas para las células de levadura, por ejemplo como las descritas en Massahi y cols. Journal of Theoretical Biology 364 (2015) 179-188, que pueden por ejemplo, incluir preferiblemente en el extremo amino terminal, la secuencia líder de secreción α PMF MQVKSIVNLLACSLAVA (SEC ID N.º 21), MQFNWNIKTVASILSALTQA (SEC ID N.º 22), MQFNVSIVSQQLLTLASVSMG (SEC ID N.º 23), MRFSTTLATAATALFFTASQVSA (SEC ID N.º 24), MESVSSLFNIFSTIMVNYKSLVLALLSVSNLKYARG (SEC ID N.º 25), MRFPSIFTAVLFAASSALA (SEC ID N.º 26), MFKSVVYSILAASLANA (SEC ID N.º 27).

Según una realización de la presente invención, la primera etiqueta del método de la invención se une covalentemente a la superficie de la célula huésped. Por consiguiente, la primera etiqueta puede, por ejemplo, unirse covalentemente a la superficie de una célula de mamífero o, por ejemplo, unirse covalentemente a la superficie de una célula de insecto o, por ejemplo, puede unirse covalentemente a la superficie de una célula de levadura. Según se usa con el método de la invención, el término «unido covalentemente» o «enlace covalente» se refiere a un enlace entre dos átomos que se forma compartiendo al menos un par de electrones, por ejemplo, enlaces formados entre C-C, C=C, N-C o S-S.

Según una realización preferida, la primera etiqueta de la presente invención es biotina, o un derivado de biotina. Por consiguiente, la primera etiqueta del método de la invención puede, por ejemplo, incluir biotina o un análogo de biotina, como destiobiotina, oxibiotina, 2'-iminobiotina, diaminobiotina, sulfóxido de biotina, biocitina, etc., que puede unirse covalentemente a la superficie de una célula huésped según la invención mediante grupos reactivos, como por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o éster de tetrafluorilo (THF). Por ejemplo, los derivados de biotina que pueden usarse como una primera etiqueta en el método de la invención también pueden incluir un enlazador, por ejemplo, -LC-biotina, -LC-LC-biotina, -SLC-biotina o -PEG_n-biotina, donde n es 3-12 (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12). Por ejemplo, la primera etiqueta puede incluir NHS-PEO4-biotina, NHS-dPEG4-biotina, NHS-PEG12-biotina, NHS-dPEG12-biotina, biotina-PEG-SCM (3,4 kD), sulfo-NHS-biotina, sulfo-NHS-LC-biotina, sulfo-NHS-LC-LC-biotina, alcoxiamina-PEG12-biotina, alcoxiamina-PEG4-biotina, hidrazida-biocitina, hidrazina-PEG4-biotina, piridildisulfuro-biotina, biotin-BMCC (1-biotinamido-4-[4'-(maleimidometil)ciclohexanocarboxamido]butano), maleimido-PEO2-biotina, mal-dPEG2-biotina, maleimido-PEG2-biotina, maleimido-PEO11-biotina, mal-dPEG11-biotina, maleimido-PEG11-biotina o yodoacetil-biotina de cadena larga (LC, por sus siglas en inglés).

Según una realización, la segunda etiqueta del método de la invención es una proteína o polipéptido adicional. Por ejemplo, la segunda etiqueta del método de la invención puede ser una proteína adicional que se une a biotina, o un derivado de biotina como se describe anteriormente.

En una realización preferida, la segunda etiqueta del método de la invención es una proteína multimérica. Por consiguiente, la proteína adicional (segunda etiqueta) puede comprender más de una proteína, por ejemplo, la segunda etiqueta puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 proteínas que pueden estar unidas covalentemente mediante, por ejemplo, uno o más enlaces disulfuro entre las proteínas individuales comprendidas en la segunda etiqueta. Las proteínas comprendidas en la segunda etiqueta del método de la invención pueden, sin embargo también estar unidas no covalentemente, por ejemplo, mediante interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas entre restos de aminoácidos cargados entre proteínas individuales que constituyen la segunda etiqueta.

Según una realización, la segunda etiqueta del método de la invención comprende uno de entre proteína A, proteína L, proteína G, fusión de proteínas A-G o dominios E, D, A, B de la proteína A. Por consiguiente, la proteína A, la proteína L, la proteína G, la fusión de proteínas A-G o dominios E, D, A, B de la proteína A de la segunda etiqueta se une específica y no covalentemente a la primera etiqueta de la invención como se describe anteriormente. Por consiguiente, la segunda etiqueta puede comprender, por ejemplo, avidina, o estreptavidina además de la proteína A, proteína L, proteína G, fusión de proteínas A-G o dominios E, D, A, B de la proteína. Por ejemplo, la segunda etiqueta del método de la invención puede comprender por ejemplo, una proteína de fusión de proteína A-avidina, o una proteína de fusión de proteína L-avidina, o una proteína de fusión de proteína G-avidina, o una proteína de fusión de proteínas A-G fusionada con avidina, o dominio E de la proteína A fusionado con avidina, o dominio D de la proteína A fusionado con avidina, o dominio A de la proteína A fusionado con avidina, o dominio B de la proteína A fusionado con avidina, o por ejemplo, proteína de fusión de proteína A-estreptavidina, o una proteína de fusión de proteína L-estreptavidina, o una fusión de proteína G-estreptavidina, o una proteína de fusión de proteínas A-G fusionada con estreptavidina, o dominio E de la proteína A fusionado con estreptavidina, o dominio D de la proteína A fusionado con estreptavidina, o dominio A de la proteína A fusionado con estreptavidina, o dominio B de la proteína A fusionado con estreptavidina. El término «proteína de fusión» o «fusión» según se usa con la segunda etiqueta de la invención se refiere a componentes, como por ejemplo, proteínas o polipéptidos que se unen por un enlace peptídico. Las proteínas de fusión de la invención pueden ser fusiones amino terminales o carboxilo terminales. En una realización, la segunda etiqueta también puede comprender neutravidina, proteínas de pollo relacionadas con avidina (AVR, p. ej., AVR4), avidina de cadena doble (dcAvd), o sus variantes de secuencia, como por ejemplo, mutante Y33H de avidina, mutante H117C de avidina, mutante [W110K] [N54A] de avidina, mutante V47G de estreptavidina, mutante S112F de estreptavidina, mutante S112R de estreptavidina o mutante S112K de estreptavidina para unirse a la primera etiqueta.

Las proteínas preferidas de la segunda etiqueta que se unen a la proteína de interés son aquellas que muestran alta afinidad por dominios Fc de anticuerpo, o regiones Fab de anticuerpo o cadenas ligeras de anticuerpo (VL-kappa), por ejemplo, que tienen una constante de unión de al menos $K_D = 10^{-9}$ M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M.

En una realización, la célula huésped del método de la invención puede seleccionarse, por ejemplo, entre células de mamífero, levadura o insecto. En una realización preferida, la célula huésped del método de la invención es una

célula de levadura del grupo compuesto por *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*.

5 Según una realización preferida, la célula huésped del método de la invención es una célula de mamífero. Por ejemplo, las células de mamífero pueden seleccionarse entre el grupo compuesto por HEK293, HEK293T, HEK293E, HEK 293F, NS0, per.C6, MCF-7, HeLa, Cos-1, Cos-7, PC-12, 3T3, Vero, vero-76, PC3, U87, SAOS-2, LNCAP, DU145, A431, A549, B35, H1299, HUVEC, Jurkat, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, Caco-2, CHO, CHO-K1, CHO-B11, CHO-DG44, BHK, AGE1.HN, Namalwa, WI-38, MRC-5, HepG2, L-929, RAB-9, SIRC, RK13, 11B11, 1D3, 2.4G2, A-10, B-35, C-6, F4/80, IEC-18, L2, MH1C1, NRK, NRK-49F, NRK-52E, RMC, CV-1, BT, MDBK, CPAE, MDCK.1, MDCK.2 y D-17.

En una realización, la célula huésped del método de la invención es una célula de insecto, que puede seleccionarse entre el grupo compuesto por células Sf9, Sf21, S2 o BTI-TN-5B1-4.

15 Según una realización, los medios para la detección específica de la proteína de interés sobre la superficie de las células huésped en el método de la invención se seleccionan entre el grupo que comprende anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, puntos cuánticos, enzimas, fluoróforos o colorantes intercalantes y gangliosidos.

Por consiguiente, los medios para la detección específicamente de la proteína de interés pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo, en el que el término «anticuerpo» se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas, o sus fragmentos, que contienen un sitio de unión a antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno específico (p. ej., la proteína de interés) o (b) derivados sustituidos de forma conservadora de dichos polipéptidos o fragmentos de inmunoglobulina que se unen inmunoespecíficamente al antígeno (p. ej., la proteína de interés [PDI]). Los anticuerpos se describen en general, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988), en el que el término «inmunoespecíficamente» según se usa en el método de la invención se refiere a la capacidad de un anticuerpo individual o un fragmento de anticuerpo como se describe en este documento para reaccionar solo con un determinante antigénico y no unirse específicamente a otros polipéptidos.

Los términos «fluoróforos», «etiqueta fluorescente» o «colorante fluorescente», o «fluoróforo» según se usa en el método de la invención para detectar específicamente la proteína de interés sobre la superficie de las células huésped se refiere a restos que absorben energía lumínica a una longitud de onda de excitación definida y emiten energía lumínica a una longitud de onda diferente. Entre los ejemplos de marcapos fluorescentes que pueden utilizarse para la detección específica de la proteína de interés según la invención puede incluirse, entre otros: cloruro de dansilo, dapoxilo, dialquilaminocumarina, isotiocianato de rodamina, Alexa 350, Alexa 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, AMCA, aminoacridina, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, carboxirrodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), Cascade Blue, Cascade Yellow, cumarina 343, colorantes de cianina (Cy3, Cy5, Cy3.5, Cy5.5), dansilo, dapoxilo, dialquilaminocumarina, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína, DM-NERF, eosina, eritrosina, fluoresceína, FAM, hidroxycumarina, IRDyes (IRD40, IRD 700, IRD 800), JOE, lisamina rodamina B, Marina Blue, metoxi cumarina, nafto fluoresceína, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, PyMPO, 5-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi fluoresceína, 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 5-carboxirrodamina, 6-carboxirrodamina, 6-carboxitetrametil amino, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy5,6-FAM, cloruro de dansilo, fluoresceína, HEX, 6-JOE, NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, ácido ftálico, ácido tereftálico, ácido isoftálico, violeta de cresilo rápido, violeta azul de cresilo, azul cresilo brillante, ácido para-aminobenzoico, eritrosina, ftalocianinas, azometinas, cianinas, xantinas, succinilfluoresceínas, criptatos de tierras raras, europio trisbipiridina diamina, criptato o quelato de europio, diamina, dicianinas, colorante La Jolla Blue, alopicocianina, alococianina B, ficocianina C, ficocianina R, tiamina, ficoeritrocianina, ficoeritrina R, REG, Rhodamine Green, rodamina isotiocianato, Rhodamine Red, TAMRA, TET, TRIT (tetrametil rodamina isotiol), tetrametilrodamina o Texas Red. Por ejemplo, los colorantes intercalantes, que pueden usarse en el método de la invención son moléculas de cromóforo típicamente planares, aromáticas o con forma de anillo. En algunas realizaciones, los colorantes intercalantes incluyen colorantes fluorescentes. En la técnica se conocen numerosos colorantes intercalantes. Algunos ejemplos no limitantes son PICO GREEN (P-7581, Molecular Probes), EB (E-8751, Sigma), yoduro de propidio (P-4170, Sigma), naranja de acridina (A-6014, Sigma), 7-aminoactinomicina D (A-1310, Molecular Probes), colorantes de cianina (p. ej., TOTO, YOYO, BOBO y POPO), SYTO, SYBR Green I, SYBR Green II, SYBR DX, OliGreen, CyQuant GR, SYTOX Green, SYTO9, SYTO10, SYTO17, SYBR14, FUN-1, DEAD Red, yoduro de hexidio, dihidroetidido, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina, DAPI, DIPI, colorante indol, colorante imidazol, actinomicina D, hidroxiestilbamidina, BOXTO, LC Green, Evagreen, Bebo.

En una realización, el método de la invención comprende poner en contacto las células huésped como se describe anteriormente con medios para detectar específicamente la proteína de interés que está unida no covalentemente a

la segunda etiqueta. Por consiguiente, los medios para detectar específicamente la proteína de interés unida no covalentemente con la segunda etiqueta de la invención pueden, por ejemplo, ser uno entre un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, scFv-Fc, scFv, (Fab')₂, Fab, dianticuerpo o anticuerpo VHH, que pueden estar acoplados opcionalmente a una etiqueta adicional. Por ejemplo, la proteína de interés puede detectarse mediante un anticuerpo policlonal o suero policlonal, anticuerpo monoclonal, scFv-Fc, scFv, (Fab')₂, Fab, minianticuerpo, dianticuerpo o anticuerpo VHH que se une específicamente a al menos un epítipo de la proteína de interés, o que puede, por ejemplo, unirse también a epítopos formados por la segunda etiqueta de la invención y la proteína de interés unida no covalentemente a la misma.

El término «fragmento Fab» que puede utilizarse según las realizaciones del método de la invención se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende una cadena ligera con una región VL y CL y una porción de cadena pesada que comprende una región CH1 y Vn. El fragmento Fab no comprende una región CH2 o CH3 (véase, p. ej., Kuby, Immunology, Segunda edición, pág. 110-11; W.H. Freeman and Co., Nueva York [1994]). Los diferentes tipos de fragmentos Fab pueden no contener región bisagra, una porción de la región bisagra o una región bisagra completa. Un «scFv-Fc» según puede usarse en el método de la invención es una proteína recombinante que es una fusión de un scFv con una región Fc (véase p. ej., Li y cols. [2000], Cancer Immunol Immunother. 49:243-252). El término «dominio Fc» o «región Fc» según se usa en el método de la invención se refiere a la porción de una inmunoglobulina, por ejemplo, una molécula de IgG que se correlaciona con un fragmento cristizable obtenido mediante digestión con papaína de una molécula de IgG. La región Fc comprende la mitad C-terminal de dos cadenas pesadas de una molécula de IgG que están unidas por enlaces disulfuro. No tiene actividad de unión al antígeno pero contiene el resto de hidrato de carbono y los sitios de unión para el complemento y los receptores de Fc, incluido el receptor FcRn. «Dominio Fc» incluye por ejemplo, regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes, por ejemplo, como los descritos en el documento WO 02/094852, así como también se han observado polimorfismos en varias posiciones en dominios Fc, incluidas, pero sin limitaciones, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358. Dentro del método de la invención, el término «Fc» puede referirse a esta región aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc.

Por ejemplo, una región Fc de IgG puede comprender un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG. El «dominio CH2» de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 231 a un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 340, donde puede unirse una cadena de hidrato de carbono al dominio CH2. El «dominio CH3» puede comprender el tramo de aminoácidos C-terminal hasta un dominio CH2 en una región Fc, por ejemplo, desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 341 hasta un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 447 de una IgG.

El término «dianticuerpo» utilizado para el método de la invención se refiere a un anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo modificado por ingeniería genética que son moléculas bivalentes, monoespecíficas o biespecíficas generadas mediante dimerización de dos fragmentos de cadena pesada variable-cadena ligera variable. El término «VHH», según se usa para el método de la invención se refiere a anticuerpos de dominio variable de cadena pesada única desprovistos de cadenas ligeras. Preferiblemente, un VHH es un fragmento de anticuerpo del tipo que puede encontrarse, por ejemplo, en Camelidae o peces cartilaginosos que están desprovistos de forma natural de cadenas ligeras, o el VHH puede ser un VHH sintético que puede construirse en consecuencia (véase, p. ej., Kim y cols. Biochimica et Biophysica Acta 1844 [2014] 1983-2001; Janssens, R. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103 [41], 15130-15135).

El término «anticuerpo policlonal» o «suero policlonal» según se usa para la detección de la proteína de interés se refiere a una mezcla heterogénea de anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B. Los diferentes anticuerpos del conjunto reconocen y se unen específicamente a diferentes epítopos, que típicamente son secuencias polipeptídicas de al menos aproximadamente 3 a 5, preferiblemente aproximadamente 5 a 10 o 15, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos, pero típicamente no más de aproximadamente 1000 aminoácidos (o cualquier número entero entre ambos), que definen una secuencia que por sí misma o como parte de una secuencia más larga, se une a un anticuerpo generado en respuesta a dicha secuencia. Un antígeno diana puede contener epítopos lineales y/o discontinuos. No existe un límite superior crítico para la longitud del fragmento, que puede (por ejemplo) comprender prácticamente la longitud completa de la secuencia del antígeno, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítopos del antígeno diana. Un epítipo para su uso en el sujeto de la invención no se limita a un polipéptido con una secuencia exacta a la de la porción de la proteína de interés a partir de la cual deriva y puede comprender variantes de secuencia. Por ejemplo, el epítipo puede comprender secuencias que contienen aproximadamente 1-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras como se describe anteriormente, preferiblemente la secuencia de aminoácidos del epítipo reconocido por el anticuerpo policlonal o el suero policlonal es al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 % idéntica a la secuencia o secuencias correspondientes de la proteína de interés. Por tanto, el término «epítipo» según se utiliza en el método de la invención abarca secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como mutaciones o modificaciones de la secuencia nativa, como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora).

Por ejemplo, la identidad de secuencia de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés o de cualquier proteína como se describe en este documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una proteína de interés de la invención, tras el alineamiento de las secuencias e introducción de los huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de varias formas que están dentro de las habilidades en la materia, por ejemplo, usando software informáticos disponibles a nivel público como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (ADNSTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluido cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento de las secuencias que se están comparando.

Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia también puede determinarse mediante métodos como los que se describen en Altschul y cols., Bull Math. Bio. 48:603 (1986), y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl Acad. Sci. USA 1992 nov 15; 89(22):10915-9. Brevemente, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de huecos de 10, una penalización de extensión de huecos de 1 y la matriz de puntuación «BLOSUM 62» de Henikoff y Henikoff como se describe a continuación (los aminoácidos se indican mediante el código estándar de una letra). A continuación se calcula el porcentaje de identidad como: $(\text{Número total de coincidencias de identidad}) / (\text{longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias}) * 100$.

20

Ala	4																			
Arg	-1	5																		
Asn	-2	0	6																	
Asp	-2	-2	1	6																
Cys	0	-3	-3	-3	9															
Gln	-1	1	0	0	-3	5														
Glu	-1	0	0	2	-4	2	5													
Gly	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
His	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
Ile	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
Leu	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
Lys	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
Met	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
Phe	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
Pro	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
Ser	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
Thr	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
Trp	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Tyr	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
Val	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4
Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	

Por ejemplo, pueden utilizarse algoritmos establecidos adicionales disponibles para alinear y determinar la similitud de dos o más secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud «FASTA» de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartida por dos o más secuencias de aminoácidos (véase, p. ej., Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988], y Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 [1990]). Brevemente, FASTA caracteriza en primer lugar la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia de consulta y una secuencia problema que tiene la densidad más alta de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup = 2), sin considerar las sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos conservadoras. A continuación, las diez regiones con la densidad de identidades más altas se puntúan de nuevo comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y se «recortan» los finales de las regiones para incluir solos aquellos restos que contribuyan a la puntuación más alta. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el «valor de corte» (calculado mediante una fórmula predeterminada en base a la longitud de la secuencia y el valor de ktup), entonces se examinan las regiones iniciales recortadas para determinar si dichas regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones con las puntuaciones más altas de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48:444 [1970]; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 25:787 [1974]), que permite inserciones y deleciones de aminoácidos. Los parámetros ilustrativos del análisis FASTA son: ktup = 1, penalización

por apertura de huecos = 10, penalización por extensión de huecos = 1 y matriz de sustitución = BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación («SMATRK»), según se explica en el apéndice 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990).

5 El término «anticuerpo monoclonal» según se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden presentarse en cantidades menores o, por ejemplo, diferencias en el grado de modificaciones postraduccionales, como glucosilación o procesamiento de la lisina terminal.

10 En una realización, el anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, scFv-Fv, scFv, (Fab')₂, Fab, dianticuerpo o anticuerpo VHH que puede usarse en el método de la invención se acopla opcionalmente o comprende una etiqueta adicional. La etiqueta adicional utilizada en el método de la invención puede ser, por ejemplo, un isótopo radioactivo, o una etiqueta fluorescente. Los términos «etiqueta fluorescente», «colorante fluorescente» o «fluoróforo» según se usan para la etiqueta adicional de la invención son como se define anteriormente, el término radioisótopo se refiere a cualquier isótopo radioactivo, por ejemplo, ¹⁴C, ³H, ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I o ¹²⁵I, que puede usarse en el método de la
15 invención para detectar la proteína de interés.

Según una realización, el método de la invención comprende seleccionar las células huésped de la etapa (d) del método de la invención como se describe anteriormente. Por consiguiente, el método de la invención comprende seleccionar células huésped como se describe anteriormente, que despliegan en su superficie la proteína de interés. El término «seleccionar» según se usa en el método de la invención se refiere al proceso de identificar y/o aislar
20 células que despliegan en su superficie la proteína de interés unida no covalentemente a una segunda etiqueta de la invención y que se ha detectado por medios descritos anteriormente y separar las células huésped de células huésped que, por ejemplo, no despliegan la proteína de interés en su superficie. La selección en el método de la invención puede comprender diversas tecnologías conocidas para el experto en la materia como, por ejemplo, purificación de células mediante inmunoadsorción (*immunopanning*) (véase, p. ej., Wysocki y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 75, No. 6, pág. 2844-2848, junio 1978), clasificación de células por activación magnética (MACS),
25 clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o tecnología de microfluidos basada en microgotas (véase, p. ej., Mazutis y cols., 2013, Nature Protocols 8, 870-891). Las células seleccionadas de la invención pueden como parte de la selección, por ejemplo, separarse y aislarse a partir de células huésped que no despliegan la proteína de interés sobre su superficie mediante métodos como los descritos anteriormente. Por ejemplo, puede
30 usarse FACS para clasificar las células en viales o recipientes diferentes, o puede usarse MACS para separar células que despliegan la proteína en su superficie, o pueden usarse tecnología de microfluidos basada en microgotas para seleccionar y aislar células huésped según la invención que despliegan la proteína de interés en su superficie.

En una realización, el método de la invención puede usar las células seleccionadas que despliegan proteínas de fenotipos alterados. Por consiguiente, la selección de células huésped mediante el método de la invención puede utilizarse para seleccionar células huésped que expresan la proteína de interés de fenotipo alterado, o al menos una proteína de interés de fenotipo alterado. El término «fenotipo alterado» según se usa en este documento se refiere a una o más propiedades alteradas de la proteína de interés, o la al menos una proteína de interés desplegada sobre la superficie de la célula huésped según la invención.

Según una realización, el fenotipo alterado de la proteína de interés desplegada sobre las células huésped según la invención puede ser uno entre nivel de expresión en superficie, estabilidad de la proteína, plegamiento de la proteína o afinidad. Por consiguiente, el método de la invención puede, por ejemplo, utilizarse para seleccionar células huésped que despliegan cantidades crecientes de la proteína de interés en comparación con una población de referencia de células huésped, que no expresan la proteína, o la al menos una proteína de interés. Por ejemplo, el
40 método de la invención puede usarse para seleccionar células huésped que portan polinucleótidos que codifican péptidos señal que dirigen con mayor eficacia la proteína de interés a la ruta de secreción de una célula, o para seleccionar polinucleótidos en los que las secuencias reguladoras se han alterado (p. ej., mutado) y dan lugar a un aumento de la expresión de la proteína de interés. Será aparente para el experto en la materia que el método de la invención y la selección como se describe anteriormente pueden repetirse por ejemplo al menos una vez, o 2, 3, 4,
45 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces para la selección o enriquecimiento de las células huésped que despliegan cantidades crecientes de la proteína de interés. A continuación, las células seleccionadas pueden, por ejemplo, usarse para aislar los polinucleótidos contenidos en ellas y, posteriormente, someter dichos polinucleótidos a secuenciación.

El aislamiento y la secuenciación del ADN pueden llevarse a cabo según protocolos convencionales conocidos en la técnica como los descritos en «Molecular Cloning», 4ª edición, CSHL, Press. Por ejemplo, los polinucleótidos (p. ej., plásmidos) en las células huésped seleccionadas según la invención pueden también realizarse usando kits disponibles en el mercado, como por ejemplo, el kit DNeasy Blood and Tissue de Quiagen o, por ejemplo, el kit MasterPure™ Yeast ADN Purification (Epicenter).

Por ejemplo, el método de la invención también puede emplearse para examinar los efectos de mutar la segunda etiqueta de la invención para evaluar los efectos de una mutación, o de al menos una o más mutaciones sobre la unión no covalente de la proteína de interés, por ejemplo, pueden examinarse los efectos de intercambios de aminoácidos no conservadores dentro de la segunda etiqueta sobre la unión no covalente de la proteína de interés.

5 Por ejemplo, la disminución de la expresión en superficie de una proteína de interés puede ser el resultado de la disminución de la unión de la proteína de interés a la segunda etiqueta de la invención en comparación con una muestra de referencia en la que la segunda etiqueta no se ha modificado. Una muestra de referencia, por ejemplo, puede comprender al menos uno, preferiblemente por ejemplo, al menos 10, 100, 10³, 10⁴, 10⁵ o 10⁶ células huésped que despliegan la proteína de interés sobre la superficie de dichas células huésped mediante el método de la invención antes de cualquier manipulación, por ejemplo, antes de uno o más intercambios de aminoácidos (conservadores o no conservadores), adición de secuencias de aminoácidos, por ejemplo, señal de N-glucosilación o, por ejemplo, maduración de la afinidad. Por tanto, la muestra de referencia puede, por ejemplo, comprender células huésped, o estar compuesta de células huésped, que no entran dentro de los parámetros de selección mediante FACS, y están comprendidas dentro de la muestra que se va a analizar.

15 Por ejemplo, el método de la invención como se describe anteriormente también puede usarse para seleccionar células huésped que despliegan la proteína de interés, o al menos una proteína de interés de fenotipo alterado, en el que el fenotipo alterado es la estabilidad de la proteína. En el método de la invención el término «estabilidad de la proteína» se utiliza en un contexto estructural, es decir, en relación con la integridad estructural de una proteína, o en un contexto funcional, es decir, en relación con la capacidad de la proteína para mantener su función y/o actividad con el tiempo. Por consiguiente, el método de la invención puede usarse para seleccionar células huésped como se describe anteriormente que despliegan en su superficie como se describe anteriormente la proteína de interés con una estabilidad de la proteína aumentada o disminuida. El aumento o la disminución de la estabilidad de la proteína puede, por ejemplo, determinarse mediante anticuerpos que reconocen o se unen específicamente a los epítopos sensibles a la conformación en la proteína de interés. Por ejemplo, la estabilidad de la proteína también puede evaluarse mediante, por ejemplo, detección cuantitativa de la proteína de interés desplegada sobre la superficie de la célula huésped según el método de la invención mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorescencia, por ejemplo, pueden usarse anticuerpos como se describe anteriormente que pueden estar unidos o conjugados con uno o más fluoróforos como se describe anteriormente para detectar la proteína de interés (PDI) sobre la superficie de la célula huésped. De este modo, las células huésped pueden someterse a continuación, por ejemplo, a análisis por FACS para evaluar los cambios en la señal total de fluorescencia en comparación con una muestra de referencia.

En una realización, el método de la invención puede usar las células huésped seleccionadas en las que el fenotipo alterado es la afinidad. Por ejemplo, el método de la invención puede usarse para seleccionar una PDI (p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe anteriormente) con aumento o disminución de la afinidad por una proteína o epítipo diana. Por consiguiente, el método de la invención puede usarse para seleccionar por ejemplo anticuerpos con aumento de la afinidad por un epítipo, en el que el método de la invención puede repetirse para seleccionar anticuerpos de afinidad aumentada por un epítipo, en el que pueden usarse plásmidos que codifican el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, tales como fragmentos que comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDR), por ejemplo, CDR1, CDR2 o CDR3, de por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas; es decir, el método de la invención puede usarse en la maduración de la afinidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe anteriormente. Según se usa para el método de la invención el término «maduración de la afinidad» se referirá a un proceso de maduración y selección sucesiva por el cual se seleccionan anticuerpos de afinidad más alta. El término «afinidad» o «afinidad de unión», según se usa con el método de la invención, incluye la fuerza de una interacción de unión y, por tanto, incluye tanto la afinidad de unión real como la afinidad de unión aparente. La afinidad de unión real es el cociente entre la velocidad de asociación y la velocidad de disociación. Por tanto, conferir u optimizar la afinidad de unión incluye alterar uno o ambos de estos componentes para conseguir el nivel de afinidad de unión deseado. La afinidad aparente puede incluir, por ejemplo, la avidéz de la interacción. Por ejemplo, un fragmento bivalente de unión a la región variable alterado puede mostrar una afinidad de unión alterada u optimizada debido a su valencia.

50 Por ejemplo, también pueden utilizarse las denominadas «bibliotecas de variantes» en el método de la invención y pueden seleccionarse células huésped que despliegan, por ejemplo, un CDR de afinidad deseada para un determinado epítipo y pueden seleccionarse mediante el método de la invención. Las bibliotecas de variantes incluyen típicamente bibliotecas de secuencias de aminoácidos *in silico* derivadas de la enumeración combinatoria del perfil variante de la biblioteca Hit. A su vez una biblioteca de variantes Hit es una biblioteca de secuencias de aminoácidos que se expresan *in vitro* mediante una biblioteca de oligonucleótidos degenerada para el cribado funcional. Las bibliotecas de variantes Hit expanden el espacio de secuencia de otras bibliotecas de variantes hit debido a la traducción inversa, uso de codones optimizados, recombinación a nivel de nucleótidos y expresión de la biblioteca de ácidos nucleicos combinatoria resultante.

60 En una realización, el método de la invención como se describe anteriormente puede usarse para seleccionar anticuerpos con aumento de la afinidad por un epítipo usando bibliotecas de variantes que comprenden secuencias variantes de CDR de cadena ligera en combinación con polinucleótidos de secuencia invariante que codifican, por

ejemplo, secuencias V_H invariantes que, por ejemplo, codifican secuencias CDR1, CDR2, CDR3 de V_H y FR (p. ej., FR1, FR2, FR3 y FR4) que, por ejemplo, codifican una V_H de afinidad predeterminada por una proteína de interés. Por ejemplo, la biblioteca de variantes de V_L puede comprender variantes de secuencia de cualquiera de los CDR de cadena ligera, por ejemplo, CDR1, CDR2, CDR3 o bibliotecas de variantes de V_L , en la que las secuencias estructurales (FR) son fijas y los polinucleótidos que codifican las CDR1, CDR2, CDR3 de V_L son de secuencia variables, por ejemplo, la biblioteca de variantes codifica FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 de V_L con secuencias variables de los polinucleótidos de CDR1, CDR2 y CDR3. La biblioteca de variantes que codifica FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 de V_L puede, por ejemplo, también ser una variante de secuencia en cualquiera de las secuencias estructurales FR1, FR2, FR3 o FR4, o por ejemplo, en ambas secuencias de CDR y FR, por ejemplo, variante de secuencia en al menos uno, dos, tres, cuatro, o cinco, seis, o todos los FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las bibliotecas de secuencias que pueden, por ejemplo, utilizarse en el método de la invención además de las descritas anteriormente, pueden incluir bibliotecas generadas mediante técnicas de PCR, como las descritas en Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 86, pág. 3833-3837, mayo de 1989; Science (1989) 246(4935):1275-1281 o Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, N.º 9 e81, en el que las bibliotecas de variantes de secuencia como se describe anteriormente están contenidas en vectores de expresión adecuados, por ejemplo, vectores de expresión que son adecuados para la expresión de V_L , o V_H en levaduras, como por ejemplo, los descritos en este documento, o por ejemplo, pESC-LEU, pESC-leu2d, p4X3, p4X4, p4X5, p4X6, o por ejemplo, los descritos en Yeast 1993 dic;9(12):1309-18. Por ejemplo, el método de la invención puede aplicarse al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis veces para seleccionar proteínas de interés, como por ejemplo, anticuerpos con propiedades deseadas, por ejemplo, para seleccionar clones de células de levadura que despliegan anticuerpos con cadenas V_L y V_H de afinidad deseada por un antígeno o epítipo de interés. Por ejemplo, el método de la invención también puede utilizarse para la maduración de la afinidad de cualquiera de los CDR de cadena pesada a través del uso de bibliotecas de variantes de secuencia de CDR de V_H mediante el método de la invención como se describe anteriormente, por ejemplo, pueden utilizarse en la maduración de la afinidad bibliotecas de variantes de secuencia de FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 de V_H en combinación con polinucleótidos de secuencia invariante que codifican una cadena de V_L . La biblioteca de variantes que codifica FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 de V_H puede ser, por ejemplo, variante de secuencia en cualquier de las secuencias estructurales FR1, FR2, FR3 o FR4, o por ejemplo, tanto en las secuencias de CDR como de FR, por ejemplo, variantes de secuencia en al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco, seis, o todos los FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En una realización, la etapa de selección del método de la invención además comprende comparar las células huésped seleccionadas con una muestra de referencia. Por consiguiente, la etapa de selección del método de la invención comprende comparar el fenotipo de una PDI seleccionada mediante el método de la invención con el mismo fenotipo de una célula huésped de referencia que despliega la PDI de fenotipo inalterado. Por ejemplo, las afinidades de unión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos desplegados sobre la superficie de células huésped como se describe anteriormente que se sometieron al menos a una ronda de maduración de la afinidad pueden compararse, por ejemplo, con la afinidad de los correspondientes anticuerpos antes de la maduración de la afinidad. Otros ejemplos pueden incluir comparar la intensidad de fluorescencia de las células huésped que han sido seleccionadas mediante el método de la invención como se describe anteriormente con una muestra de referencia en la que las células huésped no se han seleccionado mediante el método de la invención. Por ejemplo, usando un análisis por FACS las células huésped seleccionadas mediante el método de la invención pueden compararse con una muestra de referencia o, por ejemplo, dentro de un análisis por FACS típico las células huésped que no están dentro del conjunto de criterios de selección para el análisis por FACS, puede servir como muestra de referencia.

Según una realización, la proteína de interés codificada por el al menos uno o más polinucleótidos de la etapa (a) del método de la invención comprende al menos un dominio Fc, o un homodímero del dominio Fc como se describe en este documento. Por consiguiente, la proteína de interés de la presente invención puede comprender por ejemplo, al menos un dominio Fc como se describe en este documento, o al menos dos dominios Fc como se describe anteriormente, o por ejemplo, 3, 4, 5 o 6 dominios Fc.

Según una realización preferida, los dominios Fc de la proteína de interés de la invención son uno de entre IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia. Por consiguiente, la PDI de la invención puede comprender al menos uno, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 dominios Fc de IgG1 humana o por ejemplo, un dominio Fc de IgG2 humana, o un dominio de Fc de IgG2a murina, o un dominio Fc de IgG2b murina, o un dominio de Fc de IgG3 murina o sus variantes de secuencia como se describe en este documento. Las variantes de secuencia del dominio Fc de la PDI de la invención pueden además comprender una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras según se define anteriormente, que preferiblemente no reducen la unión del dominio Fc a la segunda etiqueta de la invención. En un aspecto, la proteína puede ser una proteína de fusión del extremo N-terminal del dominio Fc, una proteína de fusión del extremo C-terminal del dominio Fc o un anticuerpo, preferiblemente la proteína de interés del método de la invención es un anticuerpo monoclonal como se describe anteriormente.

Según una reivindicación preferida, la proteína de interés es un anticuerpo monoclonal que puede ser un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano, un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano. El término «anticuerpo quimérico» según se usa con o para el método de la

invencción incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente puede ser, por ejemplo, un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada mediante puentes disulfuro con una cadena L quimérica, o por ejemplo, un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H₂L₂) formado por dos dímeros HL asociados mediante al menos un puente disulfuro. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico polivalente también puede obtenerse mediante el empleo de una región CH que se agrega (p. ej., a partir de una cadena H de la IgM). Los anticuerpos, fragmentos y regiones murinos y quiméricos de la presente invencción pueden comprender cadenas pesadas (H) y/o ligeras (L) de inmunoglobulinas individuales. Por ejemplo, una cadena H quimérica puede comprender una región de unión al antígeno derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico para la proteína de interés, que se une al menos a una porción de una región C de la cadena H humana (CH), como CH1 o CH2. Una cadena L quimérica según la presente invencción comprende una región de unión al antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico para la proteína de interés, unida al menos a una porción de una región C de la cadena L humana (CL).

Por ejemplo, también pueden prepararse anticuerpos, fragmentos o derivados que tienen cadenas H y cadenas L quiméricas de la misma o diferente especificidad de unión a regiones variables mediante la asociación apropiada de las cadenas polipeptídicas individuales, según el método de etapas conocido (véase p. ej., Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press [1988]). Pueden construirse anticuerpos quiméricos mediante tecnología de ADN recombinante y estos se describen por ejemplo, en Shaw, y cols., *J. Immunol.*, 138:4534 (1987), Sun, L. K, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:214-218 (1987); Waldmann (1991), *Science* 252: 1657.

En un aspecto, la proteína de interés de la presente invencción es un anticuerpo humanizado, en el que el término «anticuerpo humanizado» según se utiliza incluye anticuerpos en los que se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como por ejemplo, ratón, conejo o rata, en las secuencias estructurales. Pueden realizarse modificaciones adicionales de la región estructural dentro de las secuencias estructurales humanas, así como dentro de las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos. El anticuerpo humanizado de la presente invencción puede estar en cualquier forma de anticuerpo, por ejemplo, como las descritas anteriormente. En algunas realizaciones se utilizan moléculas de inmunoglobulina intactas (anticuerpos de longitud completa), incluidos IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, Fab, F(ab')₂, Fv, minianticuerpo o un dianticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados que pueden utilizarse en el método de la invencción también pueden obtenerse por ejemplo, a partir de células B de animales transgénicos, que utilizan genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (véase por ejemplo, Macdonald y cols. [2014] *Proc Natl Acad Sci U S A*. abr. 8; 111[14]:5147-52).

La proteína de interés de la presente invencción también puede, por ejemplo, ser un anticuerpo humano, en el que el término «anticuerpo humano» incluye anticuerpos con regiones variables en las que tanto la región estructural como las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Si el anticuerpo humano contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invencción pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). No obstante, el término «anticuerpo humano» según se utiliza en la presente invencción no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, como por ejemplo, ratón, rata o conejo, se hayan injertado en secuencias estructurales humanas. Los anticuerpos humanos o los polinucleótidos que los codifican pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de ratones transgénicos portadores de partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema inmunitario de ratón. Por ejemplo, pueden utilizarse en el método de la invencción secuencias de polinucleótidos que codifican anticuerpos monoclonales humanos completos que se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos con fragmentos grandes de los *loci* de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas (véase, p. ej., el documento US 6 150 584). Los polinucleótidos codificados por anticuerpos humanizados pueden obtenerse, por ejemplo, mediante métodos convencionales conocidos en la técnica.

Según una realización, la segunda etiqueta de la presente invencción se une específicamente a los dominios Fc de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina. Los términos «unido específicamente» y «unión específica», según se usan a lo largo de la presente invencción y para la segunda etiqueta de la invencción, se refieren en general a la capacidad de un dominio de unión, como por ejemplo, la segunda etiqueta de la invencción, o un anticuerpo como se describe en este documento, para unirse preferiblemente a una proteína, fragmento de proteína, polipéptido o antígeno en particular que está presente en una mezcla homogénea de proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o antígenos diferentes. Típicamente, la interacción de unión específica discriminará entre proteínas, fragmentos de proteína, péptidos o antígenos deseados y no deseados en una muestra en más de 10⁷, 10⁸, 10⁹, 5 × 10⁹ o 10¹⁰, por ejemplo, la unión específica puede incluir afinidades de unión de al menos aproximadamente 10⁻⁷ M a al menos aproximadamente 10⁻¹² M, o por ejemplo, de al menos aproximadamente 1 × 10⁻⁷ M, 2,5 × 10⁻⁷ M, 5 × 10⁻⁷ M, 7,5 × 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 2,5 × 10⁻⁸ M, 5 × 10⁻⁸ M, 7,5 × 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, 2,5 × 10⁻⁹ M, 5 × 10⁻⁹ M, 7,5 × 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, 2,5 × 10⁻¹⁰ M, 5 × 10⁻¹⁰ M, 7,5 × 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M, 2,5 × 10⁻¹¹ M, 5 × 10⁻¹¹ M, 7,5 × 10⁻¹¹ M o 10⁻¹² M. Por ejemplo, la segunda etiqueta puede comprender proteína A, proteína L, proteína G, fusión de

proteínas A-G, dominios E, D, A, B de la proteína A, o fragmentos de las mismas, que se unen a dominios Fc de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina.

Además de las proteínas proporcionadas anteriormente que se unen específicamente a dominios Fc como se describe anteriormente, pueden utilizarse en el método de la invención proteínas, como por ejemplo, inmunoglobulina con nuevo receptor de antígeno (IgNAR), HCAb, anticualinas (véase, p. ej. Beste y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pág. 1898-1903, marzo 1999), miniproteínas con nudos de cistina/knotinas (véase p. ej., Kolmar, FEBS J. 2008 Jun;275[11]:2684-90), affibodies (véase p. ej. Nord y cols. Nat Biotechnol. 1997 ago;15[8]:772-7), aptámeros, DARPin (véase p. ej., Binz y cols. [2003] J. Mol. Biol. 332, 489-503) o afininas (véase p. ej., Ebersbach y cols. [2007] J. Mol. Biol. 372, 172-185) para unirse específicamente a los anticuerpos como se define en este documento, o a proteínas de interés que pueden comprender un dominio Fc, o que pueden estar desprovistas de dominio Fc.

Por ejemplo, la inmunoglobulina con nuevo receptor de antígeno (IgNAR) puede utilizarse en la presente invención como segunda etiqueta o, por ejemplo, puede estar comprendida en una segunda etiqueta según la invención. Las IgNAR derivan de peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones) y son anticuerpos de cadena pesada. Las IgNAR muestran diferencias estructurales significativas con otros anticuerpos, ya que comprenden cinco dominios constantes (CH) por cadena en lugar de los tres habituales, varios puentes disulfuro en posiciones inusuales y la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) forma un bucle extendido que cubre el sitio de unión a una cadena ligera en otros anticuerpos (véase p. ej., Barelle y cols., [2009] Adv Exp Med Biol. 655:49-62).

Por ejemplo, el término «HCAb» según se utiliza en el método de la invención, se refiere a anticuerpos encontrados en anticuerpos de especies de *Camelidae* (es decir, *Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama guanoco*, *Lama alpaca* y *Lama vicugna*) que carecen de sus cadenas L (véase p. ej., Muyldermans y cols. [2009] Veterinary Immunology and Immunopathology 128, 178-183). La cadena H de los HCAB está formada por tres en lugar de cuatro dominios globulares y los dos dominios constantes presentan una alta homología con los dominios Fc (CH2-CH3) de los anticuerpos clásicos. El dominio correspondiente con el dominio CH1 de los anticuerpos clásicos no aparece en los HCAB. Por tanto, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo clásico, el Fab, se reduce a un único dominio variable en el HCAB. Este dominio variable denominado VHH se adapta para que sea funcional para su unión al antígeno en ausencia de dominio variable de la cadena ligera (VL).

En una realización preferida, la segunda etiqueta de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1 y/o la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2. Por consiguiente, la segunda etiqueta según la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1, o la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2, o la secuencia de aminoácidos según ambas SEC ID N.º 1 y SEC ID N.º 2. La segunda etiqueta de la invención puede también comprender variantes de secuencia de cada una o de ambas SEC ID N.º 1 o SEC ID N.º 2, por ejemplo, las variantes de secuencia pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras y no conservadoras como se define anteriormente. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos no dan lugar a una pérdida de unión específica de la segunda etiqueta a la proteína de interés, por ejemplo, la afinidad de unión no debería ser mayor de 1×10^{-7} M, $2,5 \times 10^{-7}$ M, 5×10^{-7} M, $7,5 \times 10^{-7}$ M, 10^{-8} M, $2,5 \times 10^{-8}$ M, 5×10^{-8} M. Las variantes de secuencia de la etiqueta de la invención que comprenden la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2 o ambas secuencias de aminoácidos son al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 %, o de aproximadamente el 92 % a aproximadamente el 98 %, por ejemplo, el 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % idénticas a la SEC ID N.º 1 y/o SEC ID N.º 2, donde la similitud de secuencia puede calcularse como se describe anteriormente. La similitud de secuencia puede calcularse para la longitud completa de las secuencias de aminoácidos SEC ID N.º 1 y/o SEC ID N.º 2, aunque también puede calcularse para cualquier parte o posición de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N.º 1 y/o SEC ID N.º 2 de 10-100 aminoácidos, o 20-90 aminoácidos, 30-80 aminoácidos, 40-70 aminoácidos, 50-60 aminoácidos de longitud, por ejemplo de aproximadamente 15-55 aminoácidos de longitud o de aproximadamente 25-115 aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 35-95 aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 45-85 aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 46, 48, 51, 54, 56, 57, 59 o 60 aminoácidos de longitud.

Según una realización preferida, la segunda etiqueta comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 3. Por consiguiente, la segunda etiqueta de la invención comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 6 en la que el péptido señal según la SEC ID N.º 4 se ha eliminado. La segunda etiqueta de la invención puede también comprender variantes de secuencia, que pueden ser al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % idénticas a la SEC ID N.º 3, donde el porcentaje de identidad puede calcularse como se describe anteriormente, por ejemplo, para la secuencia completa de aminoácidos de SEC ID N.º 3, o por ejemplo, para cualquier parte y longitud de la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 3 como se describe anteriormente.

En un aspecto, la segunda etiqueta como se describe anteriormente puede además modificarse para comprender una o más secuencias de aminoácidos que dirigen la N-glucosilación (secuencia consenso de glucosilación). Por ejemplo, la segunda etiqueta de la invención puede modificarse para comprender la secuencia de aminoácidos N-x-S/T, donde x puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La secuencia consenso de glucosilación como se

describe puede añadirse al extremo amino terminal, o al extremo carboxilo terminal e incluirse dentro de la secuencia de aminoácidos de la segunda etiqueta de la invención según la SEC ID N.º 3, donde la secuencia consenso de glucosilación puede, por ejemplo, insertarse entre los dominios de la proteína, por ejemplo, entre la SEC ID N.º 1 y SEC ID N.º 2. La inclusión de una secuencia consenso de glucosilación dentro de la segunda etiqueta de la invención puede, por ejemplo, ser útil para aumentar los niveles de expresión de la segunda etiqueta de la invención en las células huésped, expresándose conjuntamente con la proteína de interés o, por ejemplo, expresándose mediante células adecuadas para obtener cantidades suficientes de la etiqueta de la invención para la purificación y posterior uso en el método de la invención. La segunda etiqueta de la invención puede también comprender, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que separen sus dominios individuales (p. ej., «espaciador»), como por ejemplo, las descritas en el documento WO 2014/101287.

En una realización preferida, la etapa de aislamiento y/o detección del método de la invención comprende adicionalmente las etapas de:

- (i) poner en contacto una célula huésped con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo detectablemente marcado, que se une específicamente a los dominios Fc de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o a sus variantes de secuencia,
- (ii) poner en contacto la célula huésped con un antígeno y/o epítipo unido específicamente por el anticuerpo unido a la segunda etiqueta, que está acoplada a una etiqueta detectable adicional distinta de la etiqueta utilizada en (i);
- (iii) detectar las etiquetas de (i) y/o (ii) sobre dichas células huésped;
- (iv) seleccionar células huésped que desplieguen cantidades alteradas de la etiqueta utilizada en (i), y/o la etiqueta utilizada en (ii) y/o que desplieguen cantidades alteradas de ambas etiquetas en comparación con una muestra de referencia.

El término «detectable» o «detectablemente» según se usa en el método de la invención se refiere a una molécula o partícula capaz de ser detectada, incluyendo, pero sin limitaciones, fluorescencia, quimioluminiscencia, radiación, por ejemplo, las etiquetas fluorescentes incluyen las que se han descrito anteriormente.

Por ejemplo, la etapa de aislamiento y/o detección del método de la invención como se describe anteriormente también puede llevarse a cabo poniendo en contacto una célula huésped con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado detectablemente, que se une específicamente a la cadena ligera de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, IgG4 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina; o sus variantes de secuencia, por ejemplo, a cadenas ligeras kappa o lambda humanas, cadenas ligeras kappa o lambda murinas o, por ejemplo, a fragmentos F(ab')₂ de IgG de cualquiera de entre IgG1, IgG2 humanas, IgG2a, IgG2b o IgG3 murinas. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen específicamente a epítopos de cadena ligera humana pueden, por ejemplo, incluir los descritos en Clin Immunol Immunopathol. 1991 abr;59(1):139-55. Por ejemplo, la etapa de aislamiento y/o detección del método de la invención comprende adicionalmente las etapas de:

- (i) poner en contacto una célula huésped con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo detectablemente marcado, que se une específicamente a cadenas ligeras (p. ej., cadenas ligeras kappa o lambda humanas) de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, IgG4 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia,
- (ii) poner en contacto la célula huésped con un antígeno y/o epítipo unido específicamente por el anticuerpo unido a la segunda etiqueta, que está acoplada a una etiqueta detectable adicional distinta de la etiqueta utilizada en (i);
- (iii) detectar las etiquetas de (i) y/o (ii) sobre dichas células huésped;
- (iv) seleccionar células huésped que desplieguen cantidades alteradas de la etiqueta utilizada en (i), y/o la etiqueta utilizada en (ii) y/o que desplieguen cantidades alteradas de ambas etiquetas en comparación con una muestra de referencia.

Según una realización preferida, la detección y/o selección de las etiquetas utilizadas en las etapas (i) y (ii) y en la selección de las células huésped en la etapa (iv) del método de la invención comprenden citometría de flujo y/o FACS y/o tecnología de microfluidos como se describe anteriormente.

En una realización, el método de la invención como se describe anteriormente puede repetirse. Por ejemplo, las células huésped que se han seleccionado mediante el uso del método de la invención como se describe anteriormente, puede someterse, por ejemplo, al menos a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 rondas de selección mediante

el método de la invención como se describe anteriormente. Las células huésped seleccionadas mediante el método de la invención pueden, por ejemplo, utilizarse también para aislar sus polinucleótidos y someter los nucleótidos aislados, por ejemplo, a secuenciación, amplificación mediante PCR o mutagénesis por PCR.

La amplificación mediante PCR según se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a un método en el que virtualmente cualquier secuencia de ADN diana puede amplificarse de forma selectiva. El método utiliza pares de sondas específicas de secuencia sentido y complementaria, específicas para regiones que flanquean una secuencia de ADN diana que hibridan con cadenas opuestas del ADN diana y definen los límites de la secuencia que se va a amplificar. Los oligonucleótidos específicamente diseñados inician múltiples rondas secuenciales de síntesis de ADN catalizadas por una ADN polimerasa termoestable, como la polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) o la polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Vent™, New England Biolabs) o la polimerasa TthI (Perkin-Elmer). Típicamente, cada ronda de síntesis se separa por una etapa de desnaturalización y de reapareamiento, que permite que una secuencia de ADN determinada se amplifique varios cientos de veces en menos de una hora. Los métodos para la amplificación mediante PCR se describen en la técnica (véase, p. ej., PCR Technology: Principles and Applications for ADN Amplification ed. HA Erlich, Stockton Press, Nueva York, N.Y. [1989]; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, Gelfand, Snisky, and White, Academic Press, San Diego, Calif. [1990] Mattila y cols. [1991] Nucleic Acids Res. 19: 4967). La PCR también puede utilizarse en la presente invención para la maduración de la afinidad de la PDI, por ejemplo, si la PDI es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (p. ej., CDR1, CDR2 o CDR3) de un anticuerpo fusionado o unido a la región estructural de un anticuerpo (véase, p. ej., Gram y cols., Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 abr. 15;89(8):3576-80).

En una realización, la célula huésped del método de la invención es una célula de levadura y donde la etapa (a) del método de la invención comprende además el apareamiento de al menos una primera y segunda célula de levadura, donde dicha primera y segunda célula de levadura comprenden polinucleótidos diferentes de los cuales al menos uno codifica una proteína de fusión que contiene un dominio Fc y donde dichos polinucleótidos de dichas primera y segunda células huésped comprenden al menos un marcador seleccionable diferente. El apareamiento de las células de levadura en el método de la invención puede realizarse según protocolos convencionales en la técnica, por ejemplo, según el método descrito en Weaver-Feldhaus y cols. (2004) FEBS Letters 564, 24-34, o por ejemplo, como se describe en Baek y cols., J. Microbiol. Biotechnol. (2014), 24(3), 408-420. Por consiguiente, en un aspecto del método de la invención una primera célula o células de levadura pueden ser portadoras de una biblioteca de cadenas pesadas, y una segunda célula huésped puede ser portadora de la biblioteca de cadenas ligeras, donde ambas células huésped, o polinucleótidos de la cadena pesada y ligera comprenden marcadores seleccionables diferenciados.

Por ejemplo, los apareamientos de las células de levadura en el método de la invención pueden realizarse como sigue: puede construirse la biblioteca de cadenas pesadas y desplegarse en células de levadura JAR300, que tienen los siguientes marcadores auxotróficos, ura3-52, trp1, leu2N200, his3N200, pep4:HIS3, prbd1.6R, can1 y GAL; la cepa se basa en EBY100 que se derivó de BJ5465 y es MATa. El gen KanMU4, que confiere resistencia a G418, puede por ejemplo insertarse mediante recombinación homóloga de un producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que codifica el gen KanMU4 flanqueado por 45 pb del gen URA3. El Fab de la cadena ligera puede, por ejemplo, expresarse en células YVH10, que son (Ura3, Trp3, BJ5464, MAT-alfa). Las condiciones de apareamiento pueden ser, por ejemplo, las siguientes: pueden crearse cultivos recién preparados de YVH10/pPNL30-LC (cepa MATK) y JAR300/pPNL20-HC (cepa MAT «a») en los medios seleccionables, por ejemplo SDCAA+triptófano o SDCAA+uracilo. Por ejemplo, pueden mezclarse 1 DO₆₀₀/ml (2U107 células de levadura) de cada cultivo, recogerse mediante centrifugación y resuspenderse en 200 µl de YPD, antes de colocarlo en el centro de una placa con medio YPD previamente calentada a 30 °C sin extenderlo posteriormente. A continuación, las placas pueden incubarse por ejemplo a 30 °C durante aproximadamente 4-6 h. Después las manchas de levadura pueden resuspenderse en medio SDCAA. Pueden disponerse en placas diluciones adecuadas según una formación diploide del 10 % y disponerse en una placa de agar SDCAA, o pueden crearse en medio SDCAA líquido a 30 °C con agitación. La lectura de DO₆₀₀ al inicio del crecimiento está preferiblemente, por ejemplo, por debajo de 0,1 DO₆₀₀/ml para permitir el crecimiento de los diploides que desplazan a los haploides que no crecen. Para la generación de una biblioteca de Fab, pueden usarse cantidades mayores de levadura y los volúmenes pueden ajustarse convenientemente.

En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado según la SEC ID N.º 5. El término «aislado» según se usa para el ácido nucleico de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está esencialmente libre de otras secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, al menos aproximadamente el 20 % puro, preferiblemente al menos aproximadamente el 40 % puro, más preferiblemente al menos aproximadamente el 60 % puro, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 80 % puro, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 % puro según se determina, por ejemplo, mediante electroforesis en agarosa o, por ejemplo, determinando la relación DO₂₆₀/DO₂₈₀. Puede obtenerse una secuencia de ácido nucleico aislada mediante procedimientos de clonación convencionales utilizados en ingeniería genética para reubicar la secuencia del ácido nucleico de su ubicación natural a un sitio diferente de donde se produce. Los procedimientos de clonación pueden, por ejemplo, implicar la escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula vector, o plásmido,

que puede referirse colectivamente a partir de aquí como «construcciones», «plásmidos» o «vectores», y la incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán múltiples copias o clones de la secuencia de ácido nucleico. La secuencia de ácido nucleico puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético o sintético, o cualquiera de sus combinaciones.

- 5 El término engloba, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula genómica natural pero que no está flanqueado por al menos una de las secuencias codificadoras que flanquean esa parte de la molécula en el genoma de la especie en la que se da de forma natural; (b) un ácido nucleico incorporado a un vector o dentro del ácido nucleico genómico de un procarionte o eucarionte de manera que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico natural; (c) una molécula independiente como un ADNc, un fragmento genómico, un
10 fragmento producido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR) o síntesis química, o un fragmento de restricción; (d) una secuencia de nucleótidos que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión, y (e) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de una secuencia híbrida que no se encuentra en la naturaleza. El término «ácido nucleico» según se usa en la presente invención además incluye nucleótidos y nucleósidos modificados o derivatizados como por ejemplo, pero
15 sin limitaciones, nucleótidos halogenados como, pero no solo, 5-bromouracilo, y nucleótidos derivatizados como nucleótidos marcados con biotina.

En un aspecto de la presente invención también se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que en condiciones rigurosas hibridan con la molécula de ácido nucleico según la SEC ID N.º 4. El término «condiciones rigurosas» según se usa para cualquier ácido nucleico aislado de la invención se refiere a parámetros conocidos en la técnica, por ejemplo, condiciones rigurosas, según se usa en este documento, se refiere a la hibridación en SSC
20 3,5x, solución de Denhardt 1x, tampón fosfato sódico 25 mM (pH 7,0), SDS al 0,5 % y EDTA 2 mM durante 18 horas a 65 °C. Esto va seguido de cuatro lavados del filtro, a 65 °C durante 20 minutos, en SSC 2x, SDS al 0,1 % y un lavado durante un máximo de 20 minutos en SSC 0,3x, SDS al 0,1 %. Hay otras condiciones, reactivos, etc., que pueden utilizarse, cuyo resultado es el mismo grado de rigurosidad.

25 En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico según la SEC ID N.º 5, en el que la secuencia del ácido nucleico según la SEC ID N.º 4. Por consiguiente, la proteína proporcionada por la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 3. El término «proteína aislada» según se usa para la proteína de la invención se refiere a una proteína esencialmente libre de otros componentes celulares, como por ejemplo, lípidos, ADN, ARN y proteínas celulares. Por consiguiente,
30 se dice que la proteína de la invención está esencialmente libre de componentes celulares si la proteína de la invención está al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, 95 % pura; por ejemplo, el término proteína aislada también puede referirse a una proteína producida mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico aislada en una célula huésped adecuada.

En una realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende al menos una molécula de
35 ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según la SEC ID N.º 5, o un ácido nucleico que en condiciones rigurosas hibrida con la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.º 5. Por consiguiente, la presente invención proporciona una célula huésped como se describe anteriormente, que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.º 5. Por ejemplo, la célula huésped según la invención puede comprender un vector, o un plásmido que es adecuado para permitir la expresión de la
40 secuencia de nucleótidos según la SEC ID N.º 5 en esa célula huésped. El vector de expresión exacto utilizado para dirigir la expresión del ácido nucleico de la invención según la SEC ID N.º 5 puede depender de la célula huésped, aunque puede incluir por ejemplo, pCMV, pcADN, p4X3, p4X4, p4X5, p4X6, pVL1392, pVL1393, pACYC177, PRS420, o si son sistemas de vectores basados en virus pueden usarse, por ejemplo, vectores pBABEpuro, pWPXL, derivados de pXP.

45 En una realización, la presente invención proporciona un proceso de producción de una proteína cultivando una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que puede, por ejemplo, comprender la secuencia de ácido nucleico según la SEC ID N.º 5, cultivar dichas células huésped en condiciones que son suficientes para la expresión de la proteína, expresar la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico según la SEC ID N.º 5 y aislar y purificar la proteína codificada por la SEC ID N.º 5. Por ejemplo, pueden emplearse métodos como los descritos anteriormente para introducir la molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID N.º 5 lo que puede hacerse mediante cualquier tecnología conocida en la técnica, como lipofección, electroporación, transfección con fosfato Ca o transducción vírica. A continuación, las células pueden crecerse en condiciones que sean suficientes para la expresión de proteínas. Por ejemplo, pueden dejarse crecer células de mamífero que comprendan al menos una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID N.º 3 en DMEM con FBS al 10 %, y se incubaron a 37 °C
50 en CO₂ al 10 % o, por ejemplo, en medio de cultivo sin proteínas como ayuda para el posterior aislamiento y purificación, o por ejemplo en medio de cultivo de insecto de Grace, Express Five® SFM (Life Technologies), o medio High Five® (Life Technologies), medio YNM, medio de cultivo YPD, o por ejemplo, PichiaPink (Life technologies).

Puede permitirse, por ejemplo, que las células crezcan entre 12-408 h, por ejemplo, de 12 a aproximadamente 400 h tras el sembrado, por ejemplo entre 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h a aproximadamente 120 h, 144 h, 168 h, 192, 216 h, 240 h, 264 h, 288 h, 312 h, 336 h, 360 h, 384 h, 408 h. Posteriormente, la proteína codificada por el ácido nucleico que comprende la SEC ID N.º 5 de la invención puede aislarse y purificarse. Por ejemplo, la proteína de la invención puede purificarse y aislarse mediante cromatografía, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, precipitación con sulfato de amonio o ultrafiltración.

En una realización preferida de la presente invención, la proteína purificada comprende el aminoácido según la SEC ID N.º 3. Por consiguiente, la proteína purificada según la invención carece de secuencia señal, por ejemplo, la secuencia peptídica en la que la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 4 se ha eliminado.

Según una realización preferida de la invención, la proteína aislada y purificada es un multímero, por ejemplo, la proteína aislada y purificada comprende al menos dos o cuatro subunidades que comprenden cada una la proteína según la SEC ID N.º 3, preferiblemente, la proteína aislada y purificada de la invención es un tetrámero.

En una realización de la invención la proteína aislada y purificada como se describe anteriormente, puede usarse en el método de la invención como se describe anteriormente. Por ejemplo, la proteína aislada y purificada de la invención puede utilizarse como segunda etiqueta en el método de la invención para el despliegue en superficie no covalente de proteínas que contienen Fc como se describe anteriormente. Por ejemplo, la proteína de la invención puede usarse para el despliegue en superficie de anticuerpos monoclonales, o por ejemplo, el despliegue en superficie de fragmentos de anticuerpo que contienen dominios Fc para seleccionar por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que tiene el fenotipo deseado, como por ejemplo, aumento de la afinidad por un epítipo o antígeno determinado.

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos en particular descritos en este documento ya que estos pueden variar. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación y preparación de estreptavidina-ZZ (SA-ZZ)

La secuencia de ADN para la construcción quimérica de estreptavidina y el dominio ZZ derivado de la proteína A de *Staphylococcus aureus* se sintetizó en GeneArt® (Life Technologies) y se clonó en un vector basado en pCMV que contenía el marcador de selección PAC. La secuencia sintetizada contiene: un péptido señal de la hormona del crecimiento humana, el gen de la estreptavidina, un enlazador GS y dos copias del dominio Z.

Se transfectaron células CHO-S con este plásmido para producir la proteína. A continuación, la proteína se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad usando Sepharosa activada con NHS (mediante los grupos amino primarios en la proteína) unida a IgG y cromatografía de exclusión molecular (columna HiLoad Superdex de 200 pg, GE Healthcare).

Se seleccionaron células estables y se usaron para producir la SA-ZZ. El material sin procesar secretado se purificó en Sepharosa activada con NHS (mediante los grupos amino primarios en la proteína) unidos a IgG (DI-17E6).

El análisis en gel con azul de Coomassie reveló un peso molecular aparente de 91 kD (fig. 1) teniendo el monómero un tamaño esperado de 31 kD. El análisis con el sistema Octect reveló la unión tanto de SA a la diana biotinilada como de ZZ a un anticuerpo (fig. 2). El análisis mediante inmunotransferencia también mostró que las proteínas de fusión SA-ZZ se unen tanto a la IgG como a la proteína biotinilada (fig. 1).

Ejemplo 2: Plásmidos

Todos los vectores utilizados para la transformación de levaduras se basaron en el esqueleto molecular del plásmido pYD1 comercializado por Invitrogen (Yeast Display Vector Kit, versión D, N.º V835-01). La construcción de cada vector se llevó a cabo usando la maquinaria de recombinación homóloga de *S. cerevisiae*. Se amplificaron los genes del anticuerpo con este propósito usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) con cebadores purificados mediante HPLC (Eurofins MWG Biotech) introduciendo una extensión de 40 a 50 pb de secuencias homólogas a ambos lados. Para permitir la selección de plásmidos de cadenas pesadas y ligeras en levadura, el plásmido de cadena ligera contenía un marcador auxotrófico Leu, mientras que el plásmido de cadena pesada codificaba un marcador Trp. Las regiones VH y VL de cada anticuerpo que se van a desplegar (matuzumab, adalimumab, anti-cMet-B10, trastuzumab) se clonaron en los plásmidos correspondientes que ya contenían la secuencia señal y las regiones CH1-Fc de la IgG1 (pYD-mcs-CH1-Fc) o regiones constantes lambda/kappa. La secreción del anticuerpo soluble se dirigió usando la secuencia señal MFpp8 que se clonó en marco de lectura en

sentido 5' del gen del anticuerpo. La expresión de los genes de anticuerpo se dirigió mediante el promotor Gal1 inducible por galactosa.

Ejemplo 3: Generación de la biblioteca de CDR-H3

Se pidió y se obtuvo de GeneArt® (Life Technologies) una biblioteca mutada de CDR-H3 que contenía la región VH de un anticuerpo seleccionado propio derivado del despliegue de fagos específicos de cMet humana. Dentro de la biblioteca que comprende un ADN de 30 nucleótidos de longitud, se eligió una mezcla de dopaje para mantener cada aminoácido del CDR-H3 parental con una frecuencia del 60-70 % y evitar la introducción de codones de parada, así como de restos de cisteína y metionina. La construcción de ADN bicatenario sintetizado se usó como molde para la amplificación mediante PCR. Durante la PCR se consiguió una extensión de 45 pb para la clonación de reparación de huecos en levadura a ambos extremos de la biblioteca. Se llevaron a cabo 96 reacciones utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) según el protocolo del fabricante. Para cada reacción se utilizaron 50 ng de ADN molde preamplificado en un volumen total de 50 µl. Las reacciones se combinaron tras finalizar la PCR y el material se purificó utilizando el gel Wizard® SV y el sistema PCR Clean-up (Promega) y se obtuvo una cantidad final de 102 µg de ADN de biblioteca que portaba uniones de secuencia homólogas al plásmido aceptor en posición 5' y 3' de la secuencia.

Se utilizaron los siguientes cebadores para la amplificación:

cebador sentido 5'-CTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTACAACCTCGATAAAAAGAGAAGT-GCAGCTGGTGCAGTCTG-3', cebador complementario 5'-CTCTTGGAGGAGGGTGCAGGGGAAGACCGATGG-GCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGG-3') para permitir la clonación de la biblioteca en marco de lectura con el péptido señal y la región CH1-Fc humana que ya se había incluido en el esqueleto molecular del plásmido. Para la clonación de reparación de huecos se linearizó pYD-mcs-CH1-Fc usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI y se purificó mediante el gel Wizard® SV y el sistema PCR Clean-up. La generación de la biblioteca mediante la clonación de reparación de huecos en células EBY100 se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Benatuil y colaboradores.³³ Se realizaron diez electroporaciones con 4 µg del vector linearizado y 10 µg del producto de PCR. El tamaño de la biblioteca se estimó mediante dilución en placas y se reveló en $1,5 \times 10^9$ transformantes.

Ejemplo 4: Funcionalización de la superficie celular para la captura de anticuerpos

Para la captura de anticuerpos, se construyó la proteína de fusión compuesta por estreptavidina y un dominio ZZ (SA-ZZ, véase el ejemplo 1) y se purificó a partir de células CHO-S transfectadas de forma estable. Para estudiar si la fusión puede capturar en la superficie celular manteniendo la capacidad de unión del anticuerpo, se biotilina la superficie celular usando un reactivo comercial de biotina (biotina-PEG-SCM de 3,4 kDa, Creative PEGWorks), seguido por la adición de la proteína de fusión recombinante SA-ZZ.

Inicialmente, se probaron cantidades de reactivo de biotina y SA-ZZ con el objetivo de obtener un marcaje suficiente de la superficie celular. Con ese fin, se biotilinaron células BJ5464 de *S. cerevisiae* usando 1-6 mg de biotina-PEG-SCM 3,4 kDa por 1×10^7 células. Para analizar el grado de marcaje de la superficie, las células se incubaron con estreptavidina-Dylight633 y se detectó la fluorescencia mediante citometría de flujo. La señal de fluorescencia aumentaba de manera continua con el aumento de las cantidades de reactivo (fig. 4A). Puesto que las células marcadas con 1 mg de reactivo de biotina ya mostraban un aumento de la fluorescencia de aproximadamente un orden de magnitud en comparación con el control negativo, se eligió 1 mg de reactivo para la posterior inmovilización de SA-ZZ para evitar los efectos de avididad tras la unión al antígeno que puedan surgir tras una carga de anticuerpo de alta densidad sobre la superficie celular. Se utilizaron diferentes cantidades de SA-ZZ (2 µg, 3 µg, 4 µg) para la incubación con células biotiniladas para funcionalizar la superficie celular con el dominio de captura de IgG. Las células funcionalizadas se incubaron con un anticuerpo de cabra específico de proteína A conjugado con FITC (ab7244, abcam) lo que permitió el análisis mediante citometría de flujo de la superficie celular inmovilizada. El aumento de la cantidad de SA-ZZ dio lugar a un aumento de la señal de fluorescencia (fig. 4B), causado por la mayor densidad superficial de dominios capturados inmovilizados. Se detectó un marcado cambio de fluorescencia en comparación con el control negativo para todas las concentraciones de SA-ZZ probadas.

Ejemplo 5: Captura de IgG

Se estudió la capacidad de las células funcionalizadas para seguir secretando anticuerpos de alta calidad solubles. Las células BJ5464 se transformaron con plásmidos de cadenas pesadas y ligeras que codificaban tres anticuerpos monoclonales diferentes. Estos anticuerpos eran matuzumab (K_D 113 nM), adalimumab (K_D 30 pM) y anti-cMet-B10 (analizado con K_D 40 nM) (véase: tabla 1). El análisis de la captura de IgG se llevó a cabo mediante la incubación de las células modificadas con el antígeno marcado con fluorescencia que aparece en la tabla 1 y un fragmento $F(ab')_2$ específico anti-Fc conjugado con AlexaFluor647 (109-606-008, Jackson ImmunoResearch) o un anticuerpo de cabra anti-Fc conjugado con PE (109-115-098, Jackson ImmunoResearch) para la detección del despliegue de IgG mediante citometría de flujo (fig. 5A-C). Como control negativo las células se tiñeron solo para la detección de la IgG

desplegada (fig. 5D-F). Las tres muestras de células con doble tinción probadas mostraron una señal positiva para el despliegue de anticuerpos y la unión al antígeno, indicada por una señal de fluorescencia doble positiva en comparación con el control negativo correspondiente marcado solo con anticuerpo anti-Fc.

5 Para un análisis adicional de la expresión de IgG y el grado de ocupación del dominio ZZ, se funcionalizaron células BJ5464 portadoras de plásmidos de cadenas ligeras y pesadas de matuzumab mediante el método de la invención y se indujo la expresión de anticuerpos usando medios con galactosa. Tras el marcaje celular con el dominio ZZ se dejó que las células crecieran y secretaran matuzumab. Como se esperaba, el número de dominios ZZ unidos covalentemente a la pared celular disminuyó 6 y 20 horas después de la inmovilización, debido lo más probable al crecimiento y gemación celulares, así como a la degradación o inactivación de la proteína de fusión tras una
10 incubación prolongada en medio a 20 °C (fig. 6C-E). La ocupación de los dominios ZZ inmovilizados con matuzumab (fig. 6B) se controló simultáneamente usando un anticuerpo de cabra anti Fc conjugado con PE (fig. 6I, J) que mostraba un patrón de marcaje similar al del dominio ZZ. Para estudiar si los dominios ZZ no ocupados se encontraban en la superficie celular que no estaba recubierta por matuzumab secretado, se recogieron células en tres puntos temporales tras la inducción de la secreción de matuzumab y se incubaron con un exceso de anticuerpo golimumab. La unión de golimumab a los dominios ZZ no ocupados en la superficie de las células de levadura se controló mediante la adición del correspondiente antígeno marcado con fluorescencia, TNF α . De spués de 6 horas de expresión, todas las células funcionalizadas capturaban matuzumab endógeno (fig. 4I), mientras que la tinción celular con el anticuerpo añadido externamente era baja y completamente ausente tras 20 h de incubación (fig. 4H), lo que indicaba que los dominios ZZ que se encontraban en la superficie de las células de levadura estaban completamente saturados con el anticuerpo producido a nivel endógeno.

Ejemplo 6: Cepas de levadura, medios y apareamiento

La cepa de levadura portadora de cadenas ligeras de anticuerpo era la cepa BJ5464 de *S. cerevisiae* obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). La cepa EBY100 de *S. cerevisiae* portaba cadenas pesadas de anticuerpo y se usó para generar la biblioteca parsimoniosa de cadenas pesadas. Esta cepa se obtuvo de Invitrogen como parte del kit de vector de despliegue en levaduras pYD1 (N.º V835-01, Life Technologies). El anticuerpo completo y la biblioteca fueron secretados por las células diploides resultantes tras el apareamiento.

Para el cultivo de células de levadura portadoras de plásmidos de cadenas pesadas y/o ligeras, se prepararon medios que contenían todos los reactivos esenciales excepto triptófano y/o leucina usando medio Drop Out Mix comercial y un medio mínimo SD (N.º 630414, N.º 630413, N.º 630417 y N.º 630411, Clontech). La inducción de expresión génica se llevó a cabo en el mismo medio Drop Out Mix combinado con medio mínimo SD Gal/Raf (N.º 630421, Clontech), tampón 1 M que contenía 8,56 g de NaH₂PO₄ y 5,4 g de Na₂HPO₄, pH 7,4 y PEG8000 al 11 % p/v. El medio enriquecido (YPD) utilizado para el apareamiento de células de levadura se preparó a partir de 20 g de glucosa, 20 g de peptona y 10 g de extracto de levadura (Merck KGaA). Se preparó medio de congelación usando glicerol al 2 % y base de nitrógeno para levadura (BD) de Difco™ al 0,67 %.

35 Apareamiento

El apareamiento de levaduras se utilizó para la combinación de la biblioteca de CDR-H3 en células EBY100 haploides (Mat a) con la correspondiente cadena ligera en células BJ5464 haploides (Mat α) para obtener células diploides portadoras de plásmidos de cadenas pesadas y ligeras. Por tanto, las células de levadura portadoras del plásmido para el anticuerpo, cadenas pesada o ligera, respectivamente, se cultivaron en cebador lugar
40 independientemente en sus respectivos medios selectivos durante toda la noche a 30 °C y 250 rpm. Al siguiente día se resuspendieron 1×10^8 células de cada cepa en 50 μ l de medio YPD, se mezclaron y se dejó gotear en el centro de placas de YDP previamente calentadas que se cultivaron a continuación a 30 °C durante toda la noche. A continuación la delgada capa de células se lavó con 10 ml de medio YPD. Para calcular la eficacia del proceso de apareamiento, se midió la DO₆₀₀ de la suspensión celular y se prepararon placas mediante dilución. La suspensión celular se cultivó en 500 ml de medio selectivo doble. Posteriormente se transfirieron 2×10^9 células a medio recién
45 preparado después de 24 y 48 horas de cultivo. Después de esto, las células diploides se resuspendieron en medio de congelación, se transfirieron a un vial de congelación y se conservaron a -80 °C.

Ejemplo 7: Acoplamiento entre genotipo y fenotipo y cribado de la biblioteca

Para verificar que existe una relación entre genotipo y fenotipo para el método de la invención, se realizó un experimento de mezcla. Se mezclaron células que desplegaban matuzumab que se une a EGFR (fig. 5A) con células que desplegaban trastuzumab (fig. 5B) en una relación 1 a 1 000 000, para mimetizar el tamaño de una biblioteca inmune convencional. Se inmovilizó SA-ZZ sobre la superficie de células de levadura, y la mezcla se transfirió a medio de inducción, se incubó durante 20 horas y, posteriormente, se marcó con fluorescencia con un conjugado de EGFR y ficoeritrina (EGFR-PE) y un anticuerpo anti-Fc conjugado con AlexaFluor647, y se sometió a 4
55 rondas consecutivas de clasificación (fig. 5C-F). Tras la ronda 4 de clasificación y reclasificación, se realizó un análisis celular sencillo de unión de las células a EGFR mediante citometría de flujo. De los diez clones analizados, nueve mostraron unión a EGFR-PE, lo que confirmaba un enriquecimiento con éxito (datos no mostrados).

Animados por este resultado, se llevó a cabo una maduración de la afinidad de un anticuerpo específico de cMet derivado de una campaña de cribado de una biblioteca de despliegue de fagos propia (K_D 40 nM). Con este fin, se realizó una mutagénesis parsimoniosa del bucle CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada, donde se aletorizaron los diez restos con los 19 aminoácidos excepto Cys y Met, manteniendo el aminoácido original en cada posición con una frecuencia de aproximadamente el 60-70 %. La biblioteca se construyó en la cepa EBY100 de *S. cerevisiae* dando lugar a aproximadamente $1,5 \times 10^9$ transformantes. El análisis de secuencia de clones elegidos aleatoriamente mostró una media de 3,4 sustituciones dentro de los diez restos del CDR-H3. Las células haploides de la biblioteca se aparearon con BJ5464 haploide (células MAT-alfa portadoras de la cadena ligera parental del anticuerpo con una eficacia de apareamiento del 15 %). Los diploentes se seleccionaron por su capacidad para crecer en medios selectivos dobles y recubrirse con SA-ZZ. Los anticuerpos secretados se recapturaron en la superficie celular y se marcaron con un $F(ab')_2$ anti-Fc conjugado con AlexaFluor647 y cMet conjugado con PE, y las células con doble tinción se aislaron mediante FACS (fig. 6).

Para obtener aglutinantes con la mayor afinidad, se redujo sucesivamente la concentración de cMet de 250 nM a 15 nM durante tres rondas de clasificación. Después de la tercera ronda de clasificación, se aisló ADN plasmídico de células de levadura que se utilizó para transformar células de *E. coli*. Las regiones VH de los plásmidos de cadena pesada de las colonias sencillas resultantes se secuenciaron y se usaron secuencias exclusivas para cotransformar células de levadura con el plásmido de la cadena ligera parental mediante electroporación. Se llevó a cabo un análisis fenotípico con respecto a la unión a cMet sobre la superficie de las células de levadura. A una concentración de 100 nM de cMet, una variante mostró una señal de fluorescencia ligeramente potenciada para la unión al antígeno en comparación con el anticuerpo parental tras la normalización de la relación de despliegue (fig. 7).

La secuencia seleccionada se subclonó posteriormente en un vector de mamíferos para su expresión soluble en células Expi293F™. Tras la expresión y purificación del anticuerpo, el análisis cinético de la variante de anticuerpo reveló una mejora de 5 veces en la afinidad por cMet (fig. 7D) en comparación con el anticuerpo parental (fig. 7C). Esta diferencia está dirigida principalmente por una disminución de la K_{dis} .

25 **Ejemplo 8:** Manipulación de la superficie celular

Las células de levadura se biotinilaron usando biotina-PEG-SCM de 3,4 kDa (Creative PEGWorks). Para conseguirlo, se lavaron 1×10^7 células dos veces con tampón carbonato (NaHCO_3 al 4,2 % y Na_2CO_3 al 0,034 %, pH 8) y se resuspendieron en una cantidad final de 40 μl del tampón que contenía de 1 a 4 mg de reactivo de biotina disuelto. La mezcla se incubó a continuación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y se lavaron dos veces con 1 ml de PBS que contenía glicina 100 mM para saturar la biotina-PEG-SCM libre. La posterior funcionalización de las células biotiladas se llevó a cabo incubando las células con 0,76-1,52 μM de la fusión estreptavidina-ZZ en PBS en hielo durante otros 15 minutos. En una etapa final, las células se lavaron una vez con 1 ml de PBS.

35 **Ejemplo 9:** Despliegue de IgG, tinción con fluorescencia y FACS

Para la recaptura y despliegue de moléculas de IgG secretadas sobre las células de levadura se llevó a cabo la expresión en un cultivo estático usando placas de Petri o placas de pocillos profundos durante 20 horas a 20 °C a una concentración celular inicial de 1×10^7 células/ml. Para marcar específicamente la biotina de superficie, se incubaron 1×10^7 células biotiladas con 1,3 μM de un conjugado estreptavidina-DyLight633 (Thermo Scientific/Pierce) en 20 μl a 4 °C durante 15 min sin luz y se lavó una vez con PBS tras el marcado. La tinción del dominio ZZ inmovilizado en la superficie se llevó a cabo mediante la incubación de 1×10^7 células con 3,3 μM en 20 μl de anticuerpo de cabra de detección específico de proteína A conjugado con FITC (Abcam) durante 15 min en ausencia de luz a 4 °C. Tras la incubación con el anticuerpo, las células se lavaron una vez con PBS y se mantuvieron en hielo hasta su análisis. La tinción de los anticuerpos desplegados se llevó a cabo usando 0,5 μM en 20 μl de un fragmento $F(ab')_2$ de cabra anti Fc conjugado con AlexaFluor647 o anticuerpo de cabra anti-Fc conjugado con PE (ambos de Jackson ImmunoResearch) y diferentes concentraciones del correspondiente antígeno marcado con fluorescencia (cMet o EGFR, Merck Serono y TNF α , R&D Systems). El marcaje de los antígenos cMet y EGFR se llevó a cabo usando el kit RPE rápido LYNX (BioRad). El marcaje del TNF α se llevó a cabo usando éster de NHS Dylight650 (Thermo Scientific). Para la tinción con antígeno conjugado con PE las células se incubaron en hielo y en ausencia de luz durante 15 min y se lavaron una vez con 1 ml de PBS. La concentración de anticuerpo golimumab proporcionado externamente (MSD) para marcar los dominios ZZ en superficie libres se valoró antes del experimento para determinar la intensidad de señal máxima. Las células tratadas con golimumab se incubaron posteriormente con 250 nM de TNF α conjugado con Dylight650. La selección de la biblioteca de CDR-H3 se llevó a cabo con el clasificador de células MoFlo XDP (Beckman Coulter) usando Summit 5.3. En la selección inicial se procesaron 2×10^8 células. Durante las dos rondas siguientes de clasificación la diversidad restante de la biblioteca estaba al menos 100 veces por encima de la de la muestra.

55 **Ejemplo 10:** Subclonación, expresión en mamíferos y purificación de proteínas

La subclonación de genes de anticuerpo en plásmidos de expresión en mamíferos se llevó a cabo para conseguir una producción soluble de moléculas de IgG en células Expi293F™ (Life Technologies). Por tanto, el gen de interés se amplificó con segmentos homólogos que se solapaban con el plásmido aceptor (Lucigen) mediante PCR. A continuación se incubaron células de *E. coli* químicamente competentes TOP 10 One Shot® (Life Technologies) con 1 µl del producto de PCR y 1 µl del plásmido durante 30 minutos y se transformaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. La selección de clones se llevó a cabo en placas de LB-amp. Tras la incubación a 37 °C durante 24 horas se recogieron las colonias, se aisló el ADN plasmídico y se envió a MWG Biotech para su secuenciación. A continuación, se usó el ADN plasmídico correcto para la transfección de células Expi293F™ mediante el kit de transfección ExpiFectamine™ 293 (Life Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células se incubaron a 37 °C, 180 rpm y CO₂ al 5 % durante 5 días. El sobrenadante que contenía la IgG se recogió mediante centrifugación de la suspensión celular a 1500xg durante 10 min. Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante usando columnas de centrifugación A de PROSEP® (Merck Millipore).

Ejemplo 11: Cinética de unión

La cinética de unión de las moléculas de IgG subclonadas y purificadas se analizaron usando el sistema Octet RED (ForteBio, Pall Life Science). Los anticuerpos se capturaron sobre biosensores anti-FC-humano (AHC) durante 600 s a 2,5 µg/ml en PBS. Todas las mediciones se realizaron en tampón de cinética (PBS pH 7,4, BSA al 0,1 % (p/v), Tween® 20 al 0,02 %). La asociación a cMet (10 nM, 50 nM, 100 nM) se midió durante 300 s, seguidos de la disociación durante 600 s. Se analizó un control de cada anticuerpo usando solo tampón de cinética que se restó de todas las curvas de unión resultado de la interacción con cMet. Las curvas de unión procesadas se evaluaron con el software de análisis de datos ForteBio 8.0 usando un modelo de unión 1:1 tras la filtración de Savitzky-Golay.

Ejemplo 12: Marcaje de una población de levadura que despliega IgG

Para identificar las células de levadura que despliegan IgG intacta, que se marcan mediante el ensamblaje de la cadena ligera y la cadena pesada sobre su superficie, a partir de la mezcla total de células de levadura, se indujo a estas células al despliegue en su superficie de forma no covalente como se describe anteriormente (consultar el ejemplo 9) y se tiñeron con F(ab')₂ de cabra anti-lambda o kappa humana conjugado con PE junto con antígeno conjugado con Alexa 647 (ThermoFisher). Los resultados obtenidos en el experimento muestran una correlación entre la unión al antígeno y el nivel de despliegue de IgG (fig. 11A). El experimento de la cadena ligera se realizó con dos clones de anticuerpo independientes para dos antígenos, antígeno A y antígeno B, respectivamente. Como se muestra en la figura 11B, los resultados obtenidos son comparables entre tinciones con un anticuerpo anti-Fc y con un anticuerpo anti-cadena ligera. Sorprendentemente, la tinción anti-cadena ligera mostró una mejora de la correlación (fig. 11 B).

Ejemplo 13: Enriquecimiento clonal mediante marcaje y selección de la cadena ligera

El sistema de despliegue en levadura según la invención se utilizó en un ejemplo de enriquecimiento clonal utilizando el método de tinción de la cadena ligera (consultar el ejemplo 12). Para el enriquecimiento clonal se mezclaron clones de células de levadura, que desplegaban anticuerpos específicos del antígeno Y sobre su superficie utilizando el método de la invención como se describe anteriormente (clones de despliegue en levaduras específicos del antígeno Y) con clones de despliegue en levaduras específicos del antígeno Z en una relación 1:1 000 000. Los anticuerpos específicos del antígeno Y se dirigen frente a una proteína de interés (PDI) de la que existen varias isoformas, una de las comprende el antígeno X pero no el antígeno. Por consiguiente, un anticuerpo específico del antígeno Y no reconocerá la isoforma de la PDI que comprende el antígeno X. Tras los procedimientos de manipulación de levaduras descritos en los ejemplos 1-6, se seleccionaron 10⁸ células de levadura y se clasificaron durante tres rondas de enriquecimiento usando F(ab')₂ de cabra anti-lambda humana conjugada con PE (Southern Biotech) para marcar la población de despliegue de IgG para su posterior clasificación mediante FACS. Después de tres rondas de clasificación y enriquecimiento celular usando un clasificador de células SONY SH800, las células clasificadas, es decir, las células dentro de los parámetros de selección mostrados en la figura 11B, se analizaron posteriormente incubándolas con antígeno X, antígeno Y o antígeno Z conjugado con Alexa 647 (proteína no relacionada, control negativo). Se observó una unión claramente específica para el antígeno Y conjugado con Alexa 647 de las células seleccionadas, lo que indicaba que el clon de anticuerpo correcto se había enriquecido con éxito a partir de la relación original de 1 a 1 000 000, y el clon original no deseado se había eliminado con éxito durante el proceso de selección (fig. 12).

Ejemplo 14: Selección de maduración de la afinidad mediante barajado de cadenas ligeras

Como prueba de concepto de que el método de despliegue en levaduras de la invención también puede utilizarse en la maduración de la afinidad mediante barajado de cadenas ligeras, se construyeron bibliotecas de barajado de cadenas ligeras que se emparejaron con la cadena ligera de un clon anti-antígeno 1 parental. Después de tres rondas de clasificación y enriquecimiento, que se realizaron como se describe en los ejemplos anteriores, se aislaron células de levadura de unión a antígeno de alta afinidad (fig. 13A). Se aislaron plásmidos que codificaban IgG a partir de las células de levadura recogidas, se subclonaron en vectores de expresión de mamíferos y se expresaron

en un sistema de expresión de mamíferos seguido de purificación y medición de la cinética de unión (instrumento Biacore, GE Healthcare). La afinidad de unión del clon seleccionado a partir del cribado del barajado de cadenas ligeras había mejorado aproximadamente 5 veces en comparación con el clon parental (fig. 13B).

Tablas

- 5 **Tabla 1:** Especificidades de antígeno y valores de KD de los anticuerpos desplegados en células BJ5464 mediante el método de la invención

Anticuerpo	Antígeno	KD
Matuzumab	huEGFR	0,34 nM
Adalimumab	huTNF α	30 pM
Anti-cMetB10	hucMet	40 nM

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Merck Patent GmbH

<120>Métodos de despliegue de proteínas que contienen dominios Fc no covalentes sobre la superficie de células y métodos de selección de las mismas.

<130> P 14/153

<160> 28

- 15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213>Secuencia Artificial

- 20 <220>
<223>dominio ZZ

<400> 1

ES 2 749 716 T3

Met Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu
1 5 10 15

Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile
20 25 30

Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu
35 40 45

Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Met Val Asp Asn Lys
50 55 60

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
65 70 75 80

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
85 90 95

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
100 105 110

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
115

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

5 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223>dominio SA

<400> 2

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1 5 10 15

ES 2 749 716 T3

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val
145 150 155

<210> 3

<211> 292

<212> PRT

5 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223>proteína de fusiónSA-ZZ

<400> 3

ES 2 749 716 T3

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

ES 2 749 716 T3

85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Val
165 170 175

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
180 185 190

His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser
195 200 205

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
210 215 220

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Met Val Asp Asn Lys Phe Asn
225 230 235 240

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
245 250 255

Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
260 265 270

Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
275 280 285

Gln Ala Pro Lys
290

<210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

5

<220>
 <223>péptido señalhGH

ES 2 749 716 T3

<400> 4

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
 20 25

5 <210> 5
 <211> 954
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223>Secuencia de nucleótidos de la segunda etiqueta

10 <400> 5

atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg cctgccctgg 60
 ctgcaggagg gcagcggcga cccagcaag gacagcaagg cccagggtgag cgccgcccag 120
 gccggcatca ccggcacctg gtacaaccag ctggggcagca cttcatcgt gaccgcccggc 180
 gccgacggcg ccctgaccgg cacctacgag agcgccgtgg gcaacgccga gagcaggtac 240
 gtgctgaccg gcaggtacga cagcgcccc gccaccgacg gcagcggcac cgccctgggc 300
 tggaccgtgg cctggaagaa caactacagg aacgcccaca gcgccaccac ctggagcggc 360
 cagtacgtgg gcggcgccga ggccaggatc aacaccaggt ggctgctgac cagcggcacc 420
 accgaggcca acgcctggaa gagcacctg gtggggccacg acaccttac caaggtgaag 480
 cccagcgccg ccagcatcga cgccgccaag aaggccggcg tgaacaacgg caaccctctg 540
 gacgccgtgc agcagggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc 600
 atggtggaca acaagttcaa caaggagcag cagaacgcct tctacgagat cctgcacctg 660
 cccaacctga acgaggagca gaggaacgcc ttcattcaga gcctgaagga cgaccccagc 720
 cagagcgcca acctgctggc cgaggccaag aagctgaacg acgcccaggc cccaagatg 780
 gtggacaaca agttcaaca ggagcagcag aacgccttct acgagatcct gcacctgccc 840
 aacctgaacg aggagcagag gaacgccttc atccagagcc tgaaggacga cccagccag 900
 agcgccaacc tgctggccga ggccaagaag ctgaacgacg cccaggcccc caag 954

15 <210> 6
 <211> 318
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223>Secuencia de aminoácidos de la segunda etiqueta

<400> 6

ES 2 749 716 T3

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Asp Pro Ser Lys Asp Ser
20 25 30

Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr
35 40 45

ES 2 749 716 T3

Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala
 50 55 60

Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr
 65 70 75 80

Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly
 85 90 95

Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala
 100 105 110

His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala
 115 120 125

Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn
 130 135 140

Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys
 145 150 155 160

Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys Lys Ala Gly Val Asn Asn
 165 170 175

Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys
 195 200 205

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn
 210 215 220

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 225 230 235 240

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 245 250 255

Ala Pro Lys Met Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 260 265 270

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 275 280 285

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
 290 295 300

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 305 310 315

ES 2 749 716 T3

<210> 7
 <211> 72
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

5 <220>
 <223>cebador

<400> 7

ctattgccag cattgctgct aaagaagaag ggggtacaact cgataaaaga gaagtgcagc 60
tggtgcagtc tg 72

10 <210> 8
 <211> 70
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223>cebador

15 <400> 8

ctcttggagg aggggtgccag ggggaagacc gatgggccct tggtggaggc tgaggagacg 60
gtgaccaggg 70

20 <210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223>secuencia líder artificial

<400> 9

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

val Gln Cys

25 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

30 <220>
 <223>secuencia líder artificial

<400> 10

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

val Gln Cys

<210> 11
 <211> 19

<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>secuencia líder artificial

5 <400> 11

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

10

<220>
<223>secuencia líder artificial

<400> 12

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

15 <210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

20 <220>
<223>secuencia líder artificial

<400> 13

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Trp Ala Ala Ala Thr Gly Val
1 5 10 15

Gln Ser

25 <210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>secuencia líder artificial

<400> 14

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

30 Val Gln Cys

ES 2 749 716 T3

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

5 <220>
<223>secuencia líder artificial

<400> 15

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp val Phe Leu val Ala Leu Phe Arg Gly
1 5 10 15

val Gln Cys

10 <210> 16
<211> 26
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>secuencia líder artificial

15 <400> 16

Met Asp Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu val Ala Ala Pro Arg Trp val Leu Ser
20 25

20 <210> 17
<211> 22
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>secuencia líder artificial

<400> 17

Met Asp Met Arg val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys
20

25 <210> 18
<211> 22
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>secuencia líder artificial

30 <400> 18

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
20

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
5 <213>Secuencia Artificial

<220>
<223>secuencia líder artificial

<400> 19

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

10 <210> 20
<211> 25
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

15 <220>
<223>secuencia líder artificial, x denota un tramo de 1-20 aminoácidos, donde cualquier aminoácido puede estar presente

<220>

20 <221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223>xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 20

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Xaa Arg Gly Val Phe Arg Arg
20 25

25 <210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>secuencia líder artificial

<400> 21

Met Gln Val Lys Ser Ile Val Asn Leu Leu Leu Ala Cys Ser Leu Ala
1 5 10 15

30 Val Ala

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

35 <220>

ES 2 749 716 T3

<223>secuencia líder artificial

<400> 22

Met Gln Phe Asn Trp Asn Ile Lys Thr Val Ala Ser Ile Leu Ser Ala
1 5 10 15
Leu Thr Leu Ala Gln Ala
20

<210> 23

5 <211> 21

<212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

<223>secuencia líder artificial

10 <400> 23

Met Gln Phe Asn Ser Val Val Ile Ser Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15
Ser Val Ser Met Gly
20

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

15 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223>secuencia líder artificial

<400> 24

Met Arg Phe Ser Thr Thr Leu Ala Thr Ala Ala Thr Ala Leu Phe Phe
1 5 10 15
Thr Ala Ser Gln Val Ser Ala
20

20 <210> 25

<211> 36

<212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

25 <223>secuencia líder artificial

<400> 25

ES 2 749 716 T3

Met Glu Ser Val Ser Ser Leu Phe Asn Ile Phe Ser Thr Ile Met Val
1 5 10 15

Asn Tyr Lys Ser Leu Val Leu Ala Leu Leu Ser Val Ser Asn Leu Lys
20 25 30

Tyr Ala Arg Gly
35

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

5 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223>secuencia líder artificial

<400> 26

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala

10 <210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

15 <223>secuencia líder artificial

<400> 27

Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Asn
1 5 10 15

Ala

<210> 28

<211> 21

20 <212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

<223>secuencia líder artificial

<400> 28

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

25

REIVINDICACIONES

1. Método para el despliegue de proteínas sobre la superficie de una célula huésped, comprendiendo el método:
 - 5 (a) introducir en una célula huésped al menos uno o más polinucleótidos que codifican una proteína de interés que se desea desplegar sobre la superficie de dicha célula huésped, en el que la proteína de interés comprende al menos un dominio Fc;
 - (b) poner en contacto la superficie de dicha célula huésped con una cebadora etiqueta, donde dicha cebadora etiqueta es biotina, un derivado de biotina o un análogo de biotina o se une covalentemente a la

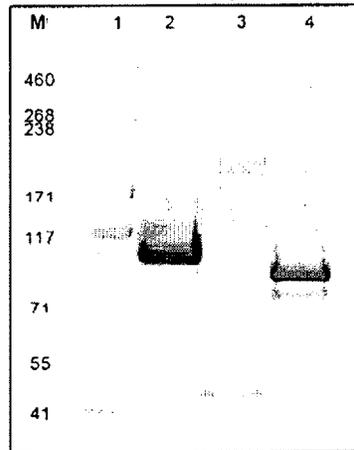
10 superficie de dicha célula huésped;
 - (c) poner en contacto la superficie de dicha célula huésped de (b) con una segunda etiqueta, donde la segunda etiqueta se une específicamente y no de forma covalente a dicha cebadora etiqueta y a dicha proteína de interés codificada por dichos al menos uno o más polinucleótidos, donde la segunda etiqueta es una proteína multimérica, que es o comprende una de entre proteína A, proteína L, proteína G, fusión

15 de proteínas A-G, dominios E, D, A, B de la proteína A, fusionada con avidina, estreptavidina, neutravidina;
 - (d) expresar dicho al menos uno o más polinucleótidos en dicha célula huésped en condiciones suficientes para la secreción de dicha proteína de interés codificada por el al menos uno o más polinucleótidos;
 - 20 (e) poner en contacto dichas células huésped de la etapa (d) con medios para detectar específicamente dicha proteína de interés unida no covalentemente mediante dicha segunda etiqueta y detectar las células huésped que despliegan la proteína de interés sobre su superficie, donde el medio para detectar específicamente dicha proteína de interés es uno de entre un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, scFv-Fc, scFv, (Fab')₂, Fab, minianticuerpo, dianticuerpo o anticuerpo VHH; opcionalmente acoplado a una etiqueta adicional y donde la etiqueta adicional es una etiqueta fluorescente o

25 radioisótopo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína codificada por el al menos uno o más polinucleótidos es un monómero o un multímero.
3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la proteína codificada por el al menos uno o más polinucleótidos comprende un péptido señal.
- 30 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula huésped se selecciona entre células de mamífero, levadura o insecto.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método además comprende seleccionar las células huésped, en el que las células huésped seleccionadas despliegan la proteína de interés de fenotipo alterado.
- 35 6. Método según la reivindicación 5, en el que el fenotipo alterado es uno de entre nivel de expresión en superficie, estabilidad de la proteína, plegamiento de la proteína o afinidad.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el fenotipo alterado se determina comparando dichas células huésped de la etapa (e) con una muestra de referencia.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el al menos un homodímero del dominio Fc es uno de entre IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia.
- 40 9. Método según la reivindicación 7, en el que la proteína que contiene el dominio Fc es una proteína de fusión del dominio Fc N-terminal, proteína de fusión del dominio Fc C-terminal o un anticuerpo.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 45 11. Método según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino, anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano, anticuerpo monoclonal humanizado o anticuerpo monoclonal humano.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la segunda etiqueta se une específicamente a los dominios Fc de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina.
- 5 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la segunda etiqueta comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1 y/o la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la segunda etiqueta comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 3.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la detección de la etapa (e) además comprende:
- 10 (i) poner en contacto dicha célula huésped con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo detectablemente marcado, que se une específicamente a los dominios Fc de la IgG1 humana, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia, o se une específicamente a cadenas ligeras kappa o lambda de IgG1 humana o murina, IgG2 humana, IgG2a murina, IgG2b murina o IgG3 murina, o sus variantes de secuencia; poner en contacto la célula huésped con un antígeno y/o epítipo unido específicamente al anticuerpo unido a la segunda etiqueta, que está acoplada a una etiqueta detectable adicional distinta de la etiqueta utilizada en (i);
- 15 (ii) detectar las etiquetas de (i) y/o (ii) sobre dichas células huésped;
- (iii) seleccionar células huésped que desplieguen cantidades alteradas de la etiqueta utilizada en (i), y/o la etiqueta utilizada en (ii) y/o que desplieguen cantidades alteradas de ambas etiquetas en comparación con una muestra de referencia.
- 20 16. Método según la reivindicación 15, en el que las etiquetas de (i) y (ii) y/o la etapa de selección (iv) comprenden citometría de flujo y/o FACS y/o tecnología de microfluidos, en el que se repiten las etapas (a)-(e).
- 25 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que la célula huésped es una célula de levadura y en el que la etapa (a) comprende además el apareamiento de al menos una cebadora y segunda célula de levadura, en el que dicha cebadora y segunda célula de levadura comprenden polinucleótidos diferentes de los que al menos uno codifica una proteína de fusión que contiene un dominio Fc y en el que dichos polinucleótidos de dichas cebadora y segunda célula huésped comprenden al menos un marcador seleccionable diferente.
- 30 18. Método según la reivindicación 17, en el que dicha cebadora célula de levadura comprende polinucleótidos que codifican cadenas ligeras de inmunoglobulina y/o en el que dicha segunda célula de levadura comprende polinucleótidos que codifican cadenas pesadas de inmunoglobulinas.
- 35 19. Método según la reivindicación 18, en el que dicha cebadora célula de levadura comprende polinucleótidos que codifican una biblioteca de cadenas ligeras de inmunoglobulina y en el que dicha segunda célula de levadura comprende polinucleótidos que codifican cadenas pesadas de inmunoglobulina de afinidad predeterminada por la proteína de interés.
20. Uso de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 3 en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-19.
- 40 21. Método según la reivindicación 1, en el que la segunda etiqueta comprende proteínas de pollo relacionadas con avidina (AVR, p. ej., AVR4), avidina de cadena doble (dcAcd), mutante Y33H de avidina, mutante H117C de avidina, mutante [W110K] [N54A] de avidina, mutante V47G de estreptavidina, mutante S112F de estreptavidina, mutante S112R de estreptavidina o mutante S112K de estreptavidina.

Análisis SDS-CB:



Pocillo 1: Marcador

Pocillo 2: Muestra de referencia DI-17E6 (EMD52579)

Pocillo 3: Estreptavidina (Calbiochem 189730)

Pocillo 4: Quimera SA-ZZ purificada (P2859UN)

Gel: Tris-acetato 3-8 %

Fig. 1A

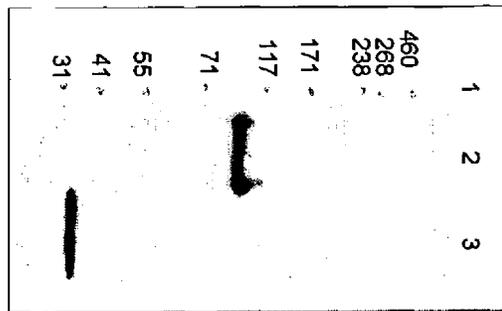
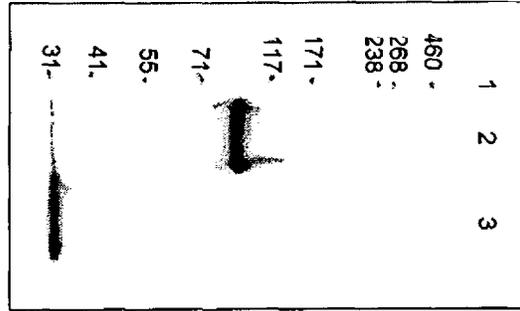
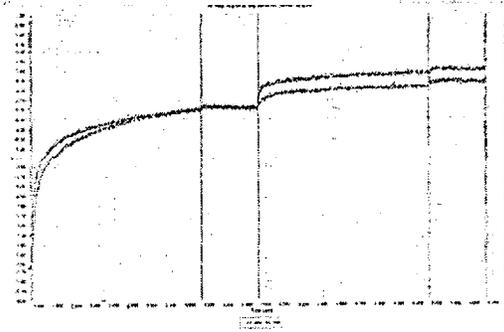
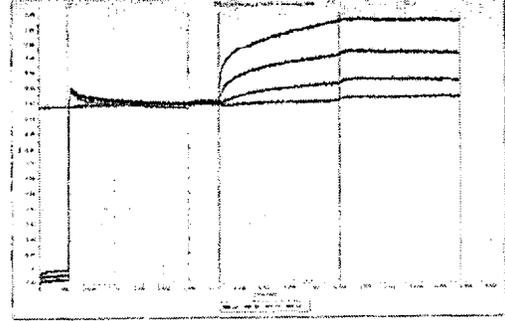


FIG. 1B



015-11-001



015-11-003



Fig. 2

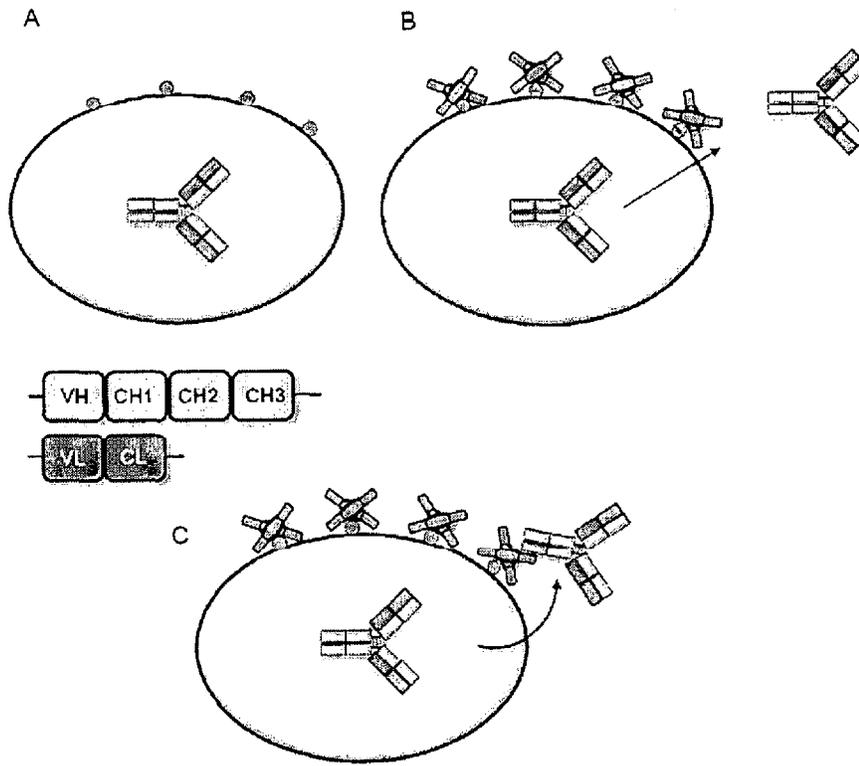


Fig. 3

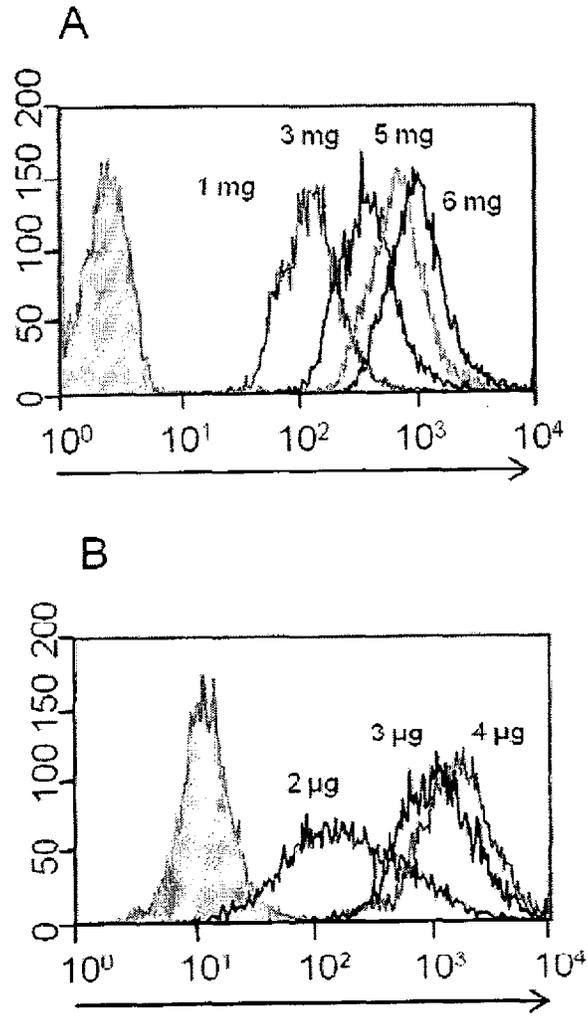


Fig. 4

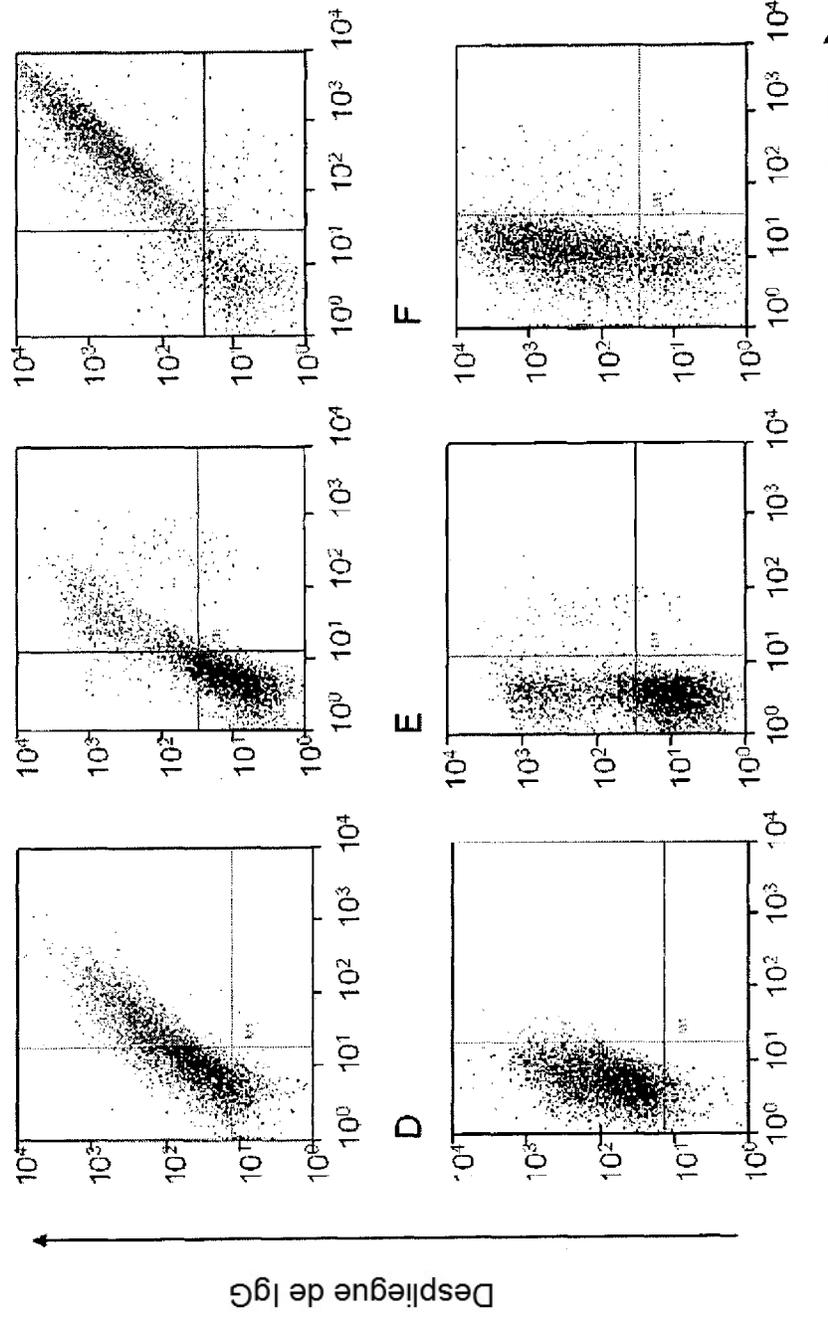


Fig. 5

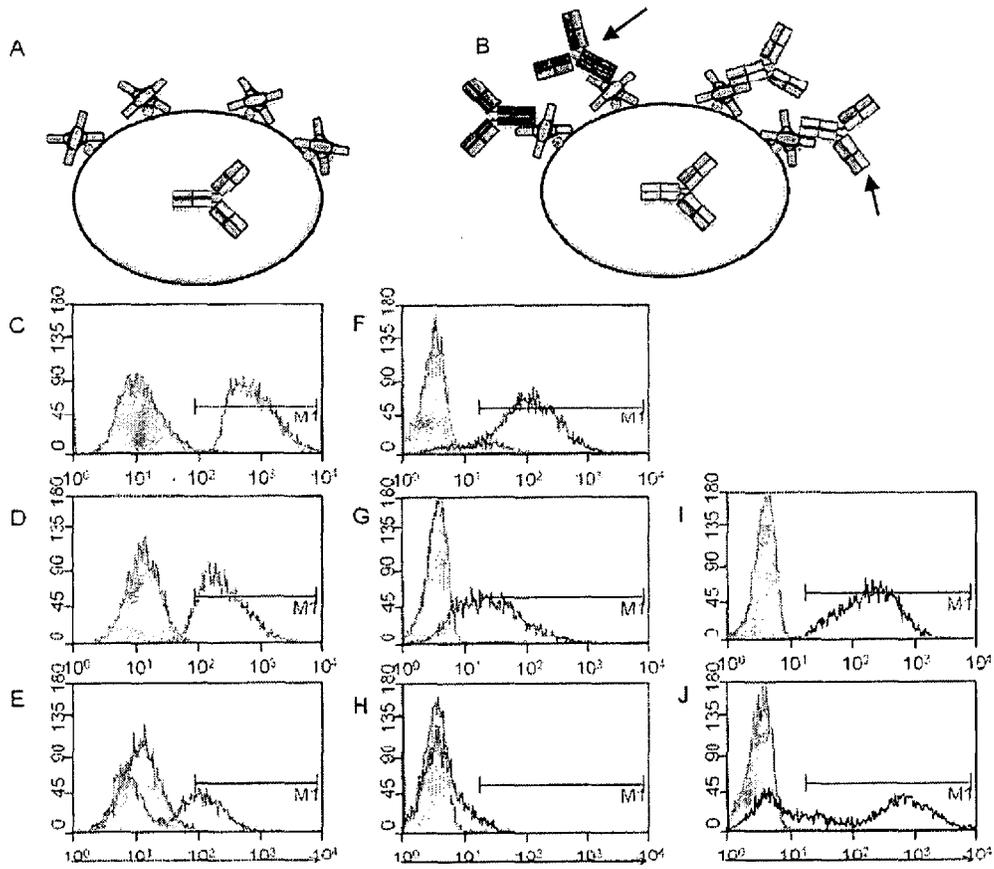


Fig. 6

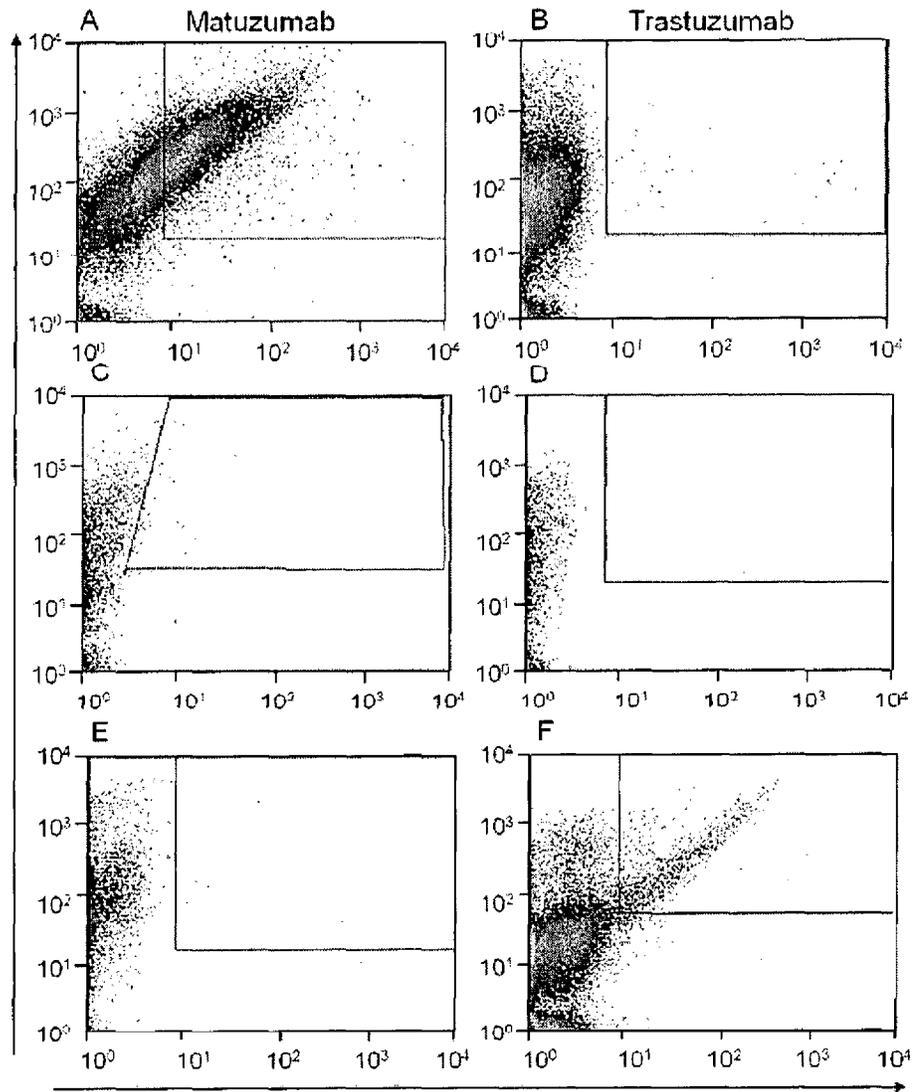


Fig. 7

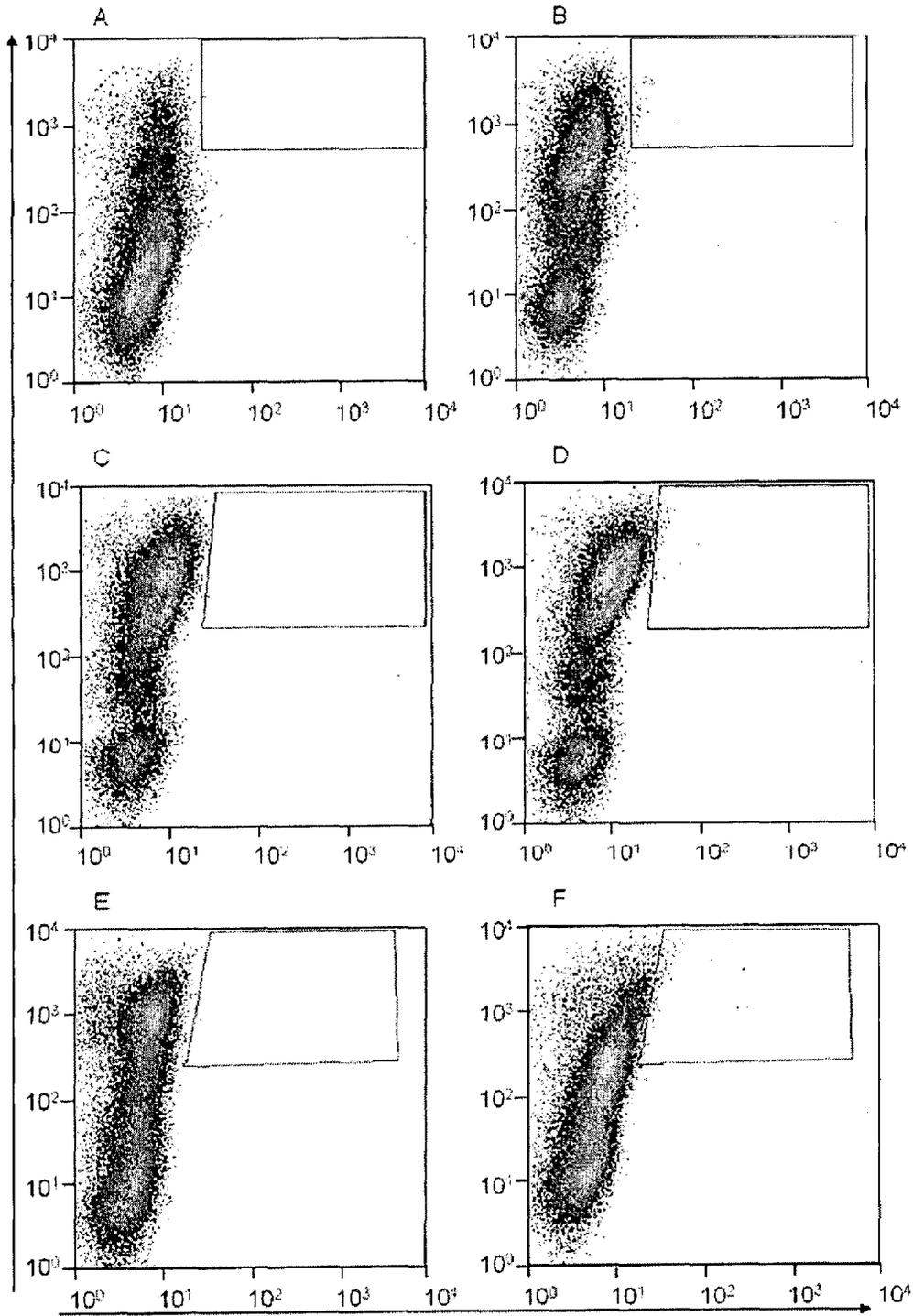


Fig. 8

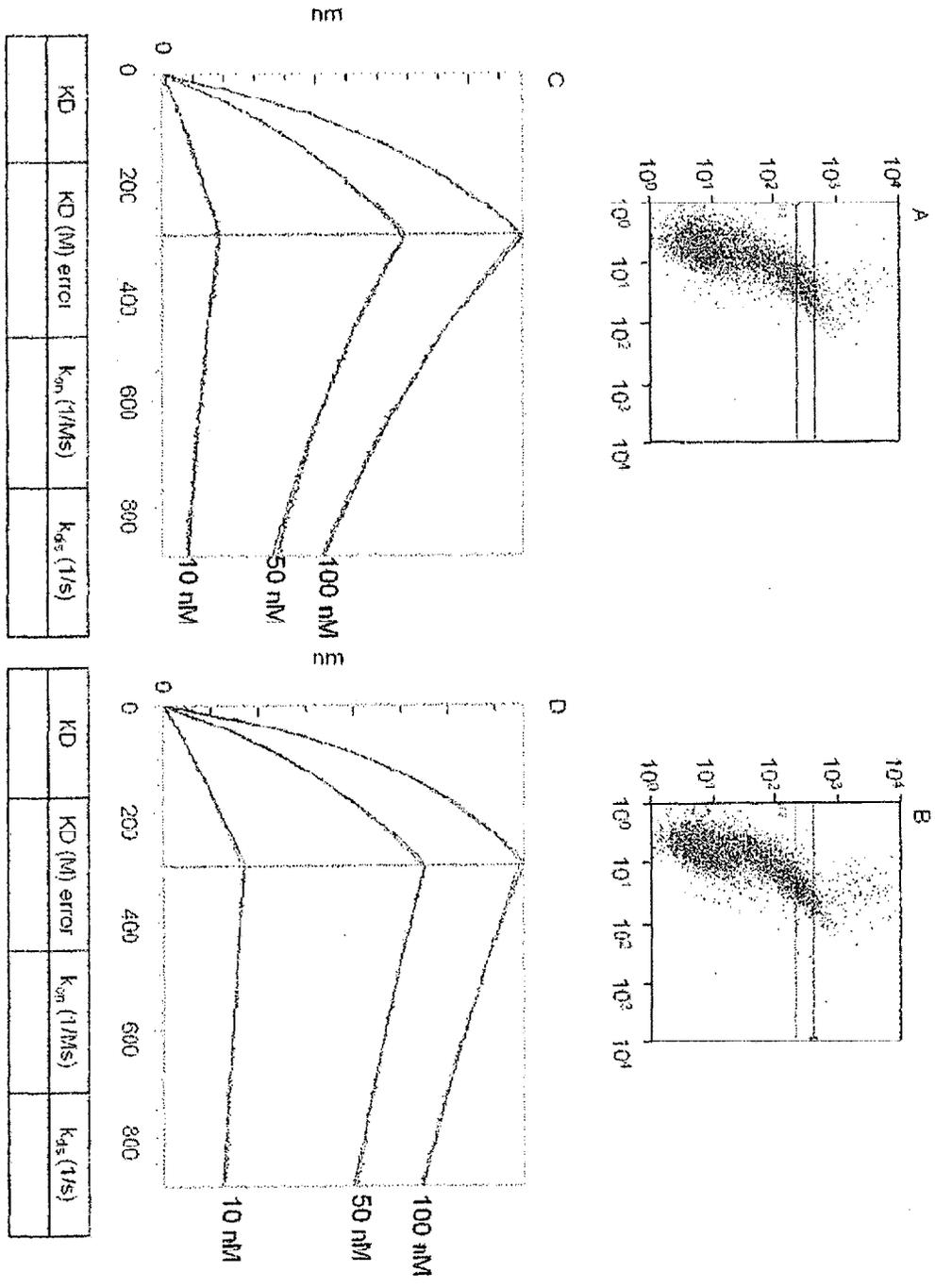


Fig. 9

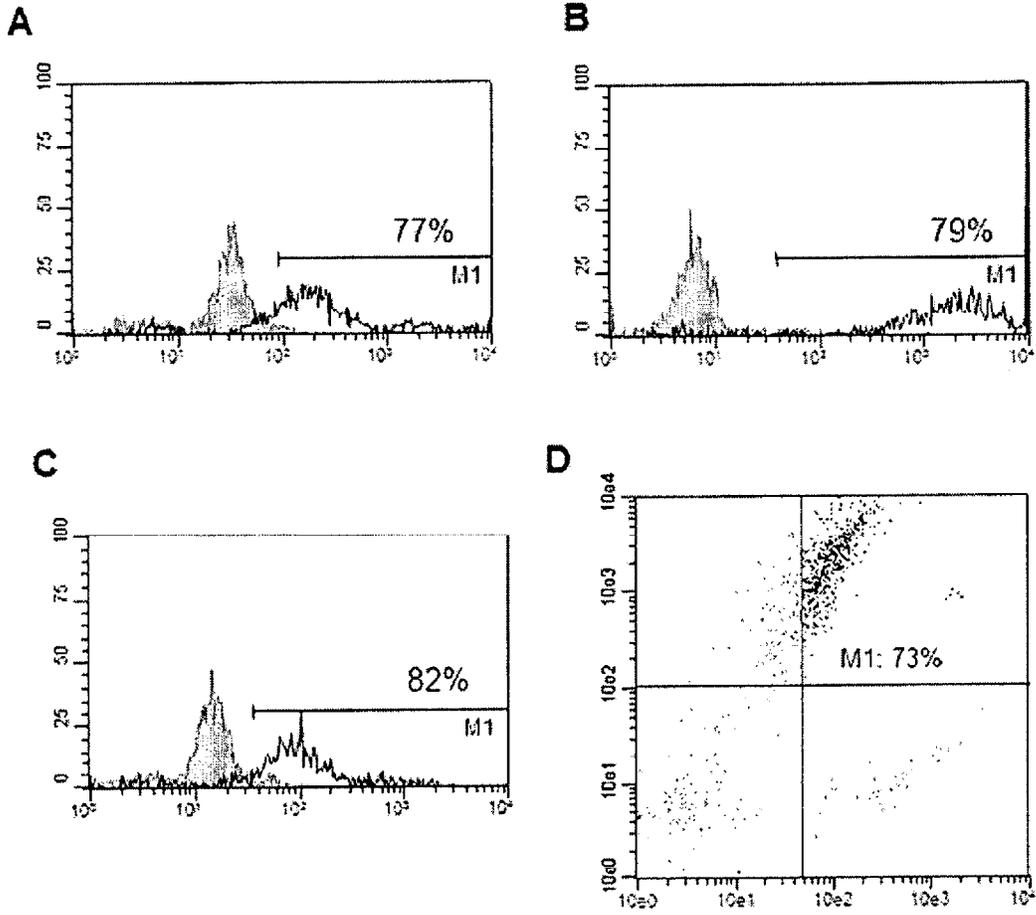


Fig. 10

A

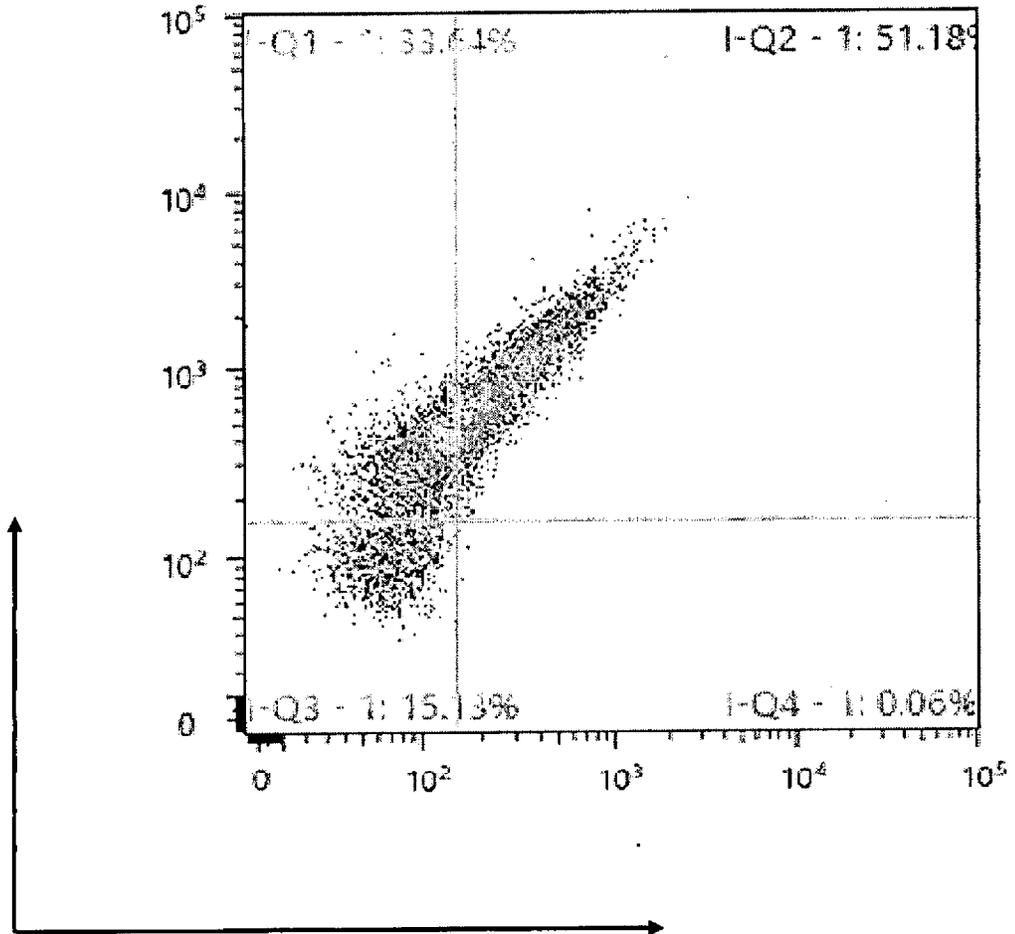
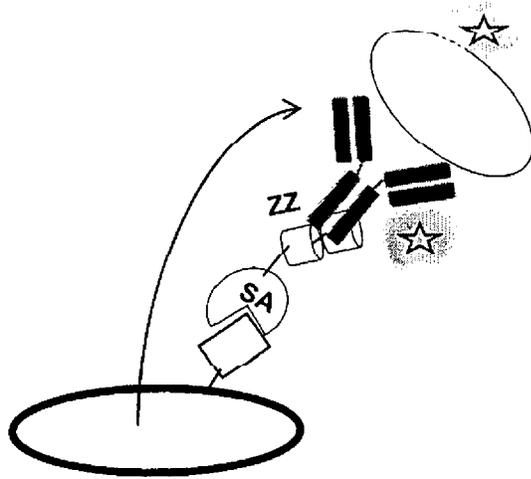


Fig. 11

B

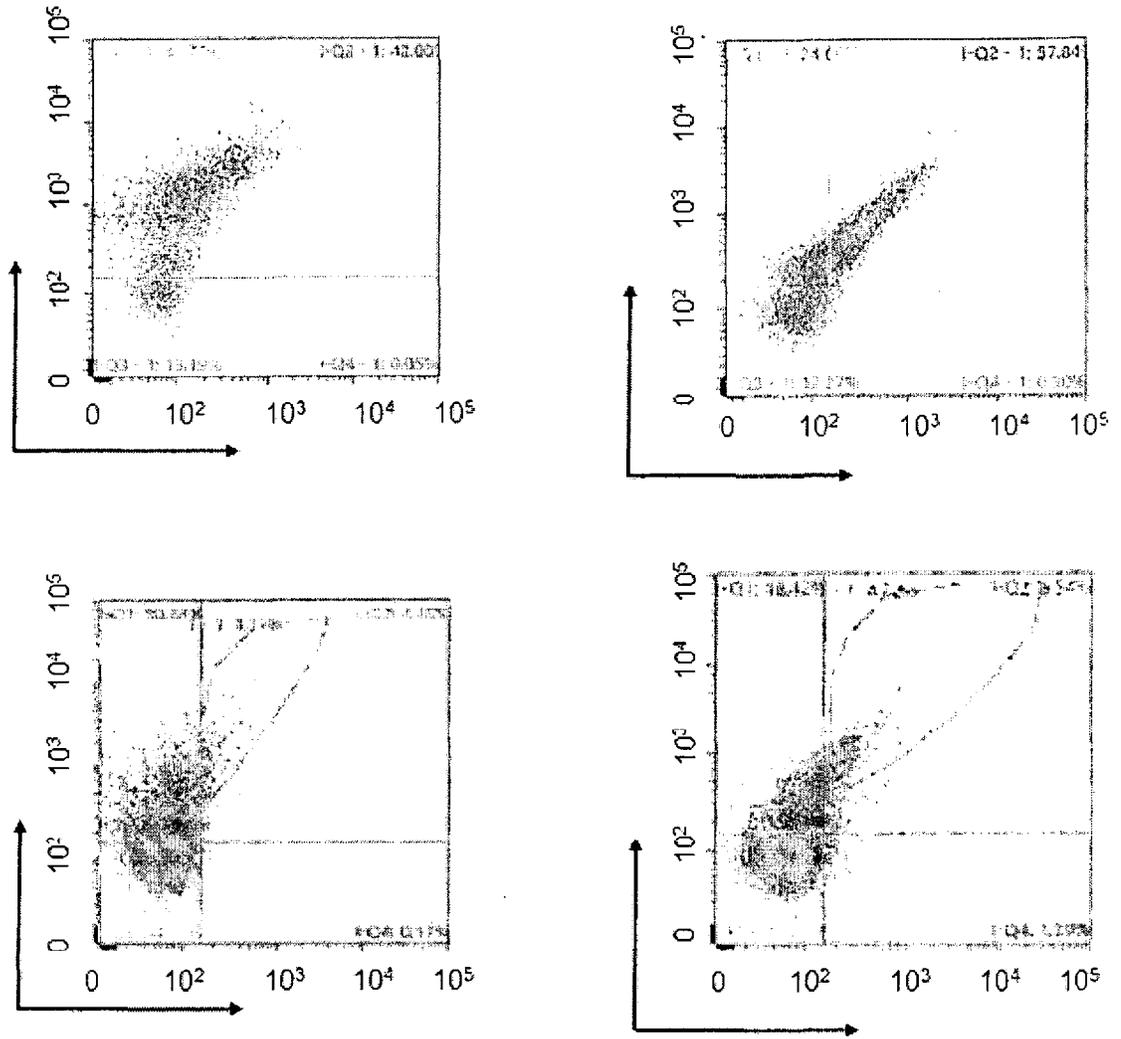


Fig. 11

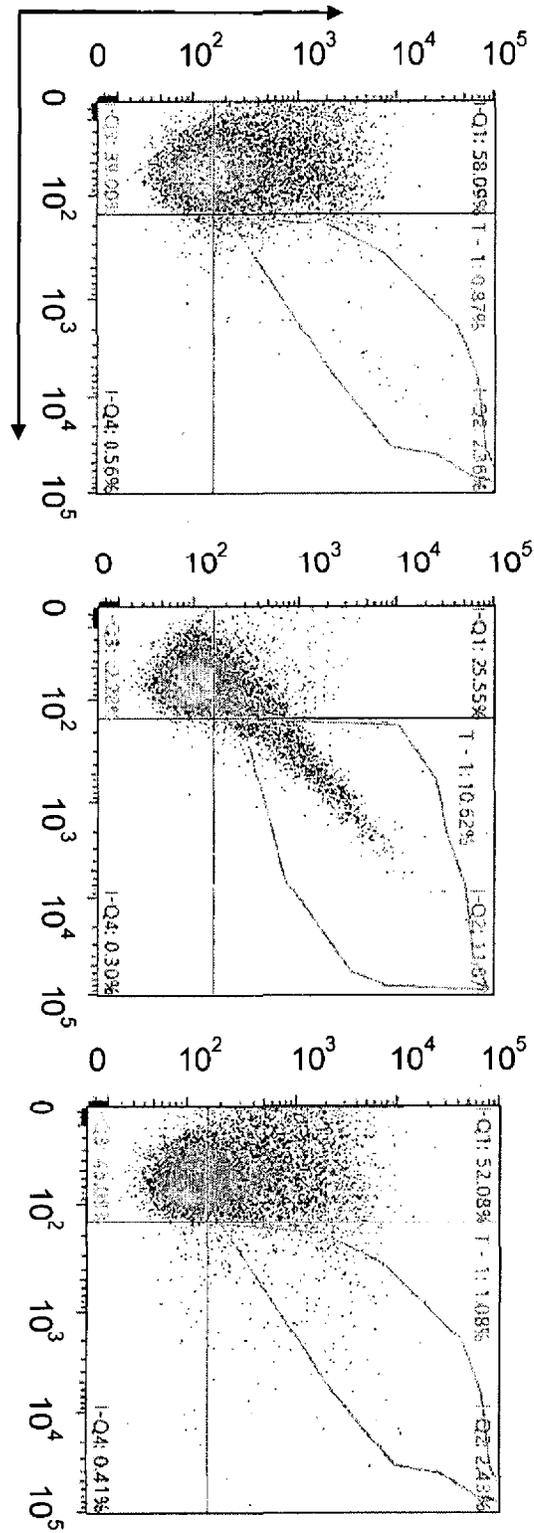


Fig. 12

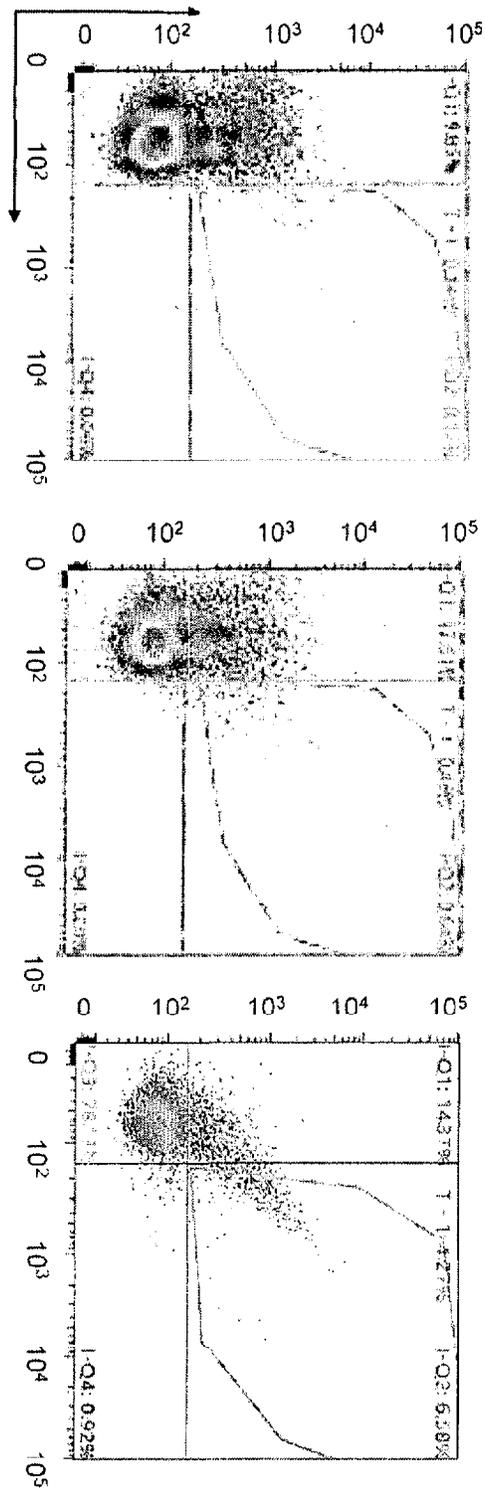
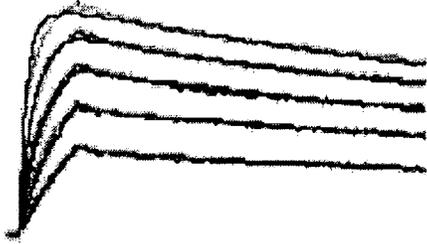


Fig. 13A

K_D 56 pM



K_D 322 pM



Fig. 13B