

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.01.20**

(30) Prioridade(s): **1998.01.20 US 9388**
1998.08.26 US 140084

(43) Data de publicação do pedido: **2000.12.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.12.11**
036/2014

(73) Titular(es):

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS
352 HENRY ADMINISTRATION BUILDING 506
SOUTH WRIGHT STREET URBANA, IL 68101 US**

(72) Inventor(es):

DANE K., WITTRUP US
MICHELE C. KIEKE US
DAVID M. KRANZ US
ERIC SHUSTA US
ERIC T. BODER US

(74) Mandatário:

**LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO
PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598
CHARNECA DA CAPARICA** PT

(54) Epígrafe: **EXIBIÇÃO À SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DE LEVEDURAS DE PROTEÍNAS E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM MÉTODO GENÉTICO PARA PRENDER OS POLIPEPTÍDEOS À PAREDE DA CÉLULA DE LEVEDURA NUMA FORMA ACESSÍVEL PARA LIGAÇÃO A MACROMOLÉCULAS. COMBINANDO ESTE MÉTODO COM SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ATIVADAS POR FLUORESCÊNCIA PROPORCIONA-SE UM MEIO DE SELECIONAR PROTEÍNAS COM MAIOR OU MENOR AFINIDADE PARA UMA OUTRA MOLÉCULA, ESPECIFICIDADE ALTERADA, OU LIGAÇÃO CONDICIONAL. TAMBÉM É FORNECIDO UM MÉTODO PARA A FUSÃO GENÉTICA DO TERMINAL N DE UM POLIPEPTÍDEO DE INTERESSE PARA O TERMINAL C DA PAREDE CELULAR DA PROTEÍNA DE LEVEDURA AGA2P. A LIGAÇÃO DE UM FRAGMENTO DE ANTICORPO SCFV COM A AGLUTININA AGA2P EFETIVAMENTE IMITA A EXPOSIÇÃO DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DE ANTICORPOS POR CÉLULAS B DO SISTEMA IMUNITÁRIO PARA A MATURAÇÃO DE AFINIDADE IN VIVO. MUTANTES DE RECEPTORES DE CÉLULAS T QUE SÃO EXIBIDOS DE FORMA EFICIENTE NA SUPERFÍCIE DA CÉLULA DE LEVEDURA PODEM SER ISOLADOS POR ESTE MÉTODO, FORNECENDO UM MEIO PARA A ALTERAÇÃO DO RECEPTOR DE AFINIDADE DE LIGAÇÃO E ESPECIFICIDADE DE CÉLULAS T POR RASTREIO DA BIBLIOTECA. O MÉTODO DE SELEÇÃO TAMBÉM IDENTIFICA PROTEÍNAS COM CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS MELHORADAS, PROTEÍNAS QUE SÃO EXIBIDAS EM NÍVEIS MAIS ELEVADOS, PROTEÍNAS QUE SÃO SEGREGADAS COM MAIOR EFICIÊNCIA E PROTEÍNAS QUE SÃO MAIS ESTÁVEIS.

DESCRIÇÃO
EXIBIÇÃO À SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DE LEVEDURAS DE PROTEÍNAS
E SUAS UTILIZAÇÕES

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se genericamente aos campos da imunologia e da química de proteínas. Mais especificamente, a presente invenção relaciona-se com a exibição de péptidos e proteínas na superfície da célula de levedura para a seleção de sequências com características fenotípicas reforçadas a partir de bibliotecas combinatórias.

Descrição da Técnica Relacionada

A combinação da estrutura do local do anticorpo pode ser prevista com precisão razoável a partir de dados de sequência de polipeptídeo, mas a capacidade de manipular racionalmente melhorias na afinidade e especificidade da ligação tem-se revelado mais fugaz, apesar de alguns sucessos (por exemplo, Roberts et al, 87'; Riechmann et al., 92). Como resultado, a mutagénese e o rastreio de bibliotecas representa atualmente a abordagem mais frutífera para dirigir a maturação de afinidade de anticorpos. A triagem de bibliotecas combinatórias e seleção de métodos toARNram-se uma ferramenta comum para alterar as propriedades de reconhecimento de proteínas (Ellman et al., 1997, Phizicky & Fields, 1995). Em particular, a construção e o rastreio de repertórios imunitários de anticorpos *in vitro* promete um controlo melhorado sobre a força e especificidade das interações anticorpo-antigénio.

A técnica mais comum é da apresentação de fagos, em que a proteína de interesse é expressa como um polipeptídeo de fusão com uma proteína de revestimento do bacteriófago e subsequentemente pesquisada por ligação ao ligando biotinilado imobilizado ou solúvel (por exemplo, Huse et al, 89; Clackson et al., '91; Marks et al, 92). As fusões são feitas mais frequentemente a uma proteína de revestimento menor, chamada a proteína do gene III (pIII), que está presente em três a cinco cópias na ponta do fago. Um fago construído desta maneira pode ser considerado uma "unidade" genética compacta, possuindo tanto o fenótipo (atividade de ligação do anticorpo apresentado) e o genótipo (o gene que codifica para o anticorpo) num único pacote. A exibição de fagos tem sido aplicada com sucesso a anticorpos, proteínas de ligação de ADN, inibidores da protease, péptidos curtos e enzimas.

Os anticorpos que possuem propriedades de ligação desejáveis são selecionados por ligação ao antígeno imobilizado num processo chamado "filtração". Os fagos tendo anticorpos não específicos são removidos por lavagem, e então os fagos ligados são eluídos e amplificados por infecção de *E. coli*. Esta abordagem tem sido usada para gerar anticorpos contra vários antígenos, incluindo: antígeno de superfície da hepatite B (Zebedee et al, '92); polissacáridos (Deng et al, 94), factor de crescimento semelhante à insulina 1 (Garrard & Henner, 93), 2-feniloxazol-5-ona (Riechmann e Weill, '93), e ácido capróico de 4-hidroxi-5-iodo-3-nitro-fenacetilo-(NIP) (Hawkins et al., 92).

No entanto, a apresentação de fagos possui várias deficiências. Embora a filtração de anticorpos de

bibliotecas de apresentação de fagos seja uma tecnologia poderosa, possui várias dificuldades inerentes que limitam a sua aplicação com sucesso generalizado. Por exemplo, algumas proteínas eucarióticas segregadas e proteínas da superfície das células requerem modificações pós-traducionais tais como a glicosilação ou isomerização extensiva de dissulfureto que não estão disponíveis em células bacterianas. Além disso, a natureza da exibição por fagos opõe-se à discriminação quantitativa direta dos parâmetros de ligação ao ligando. Por exemplo, anticorpos de afinidade muito elevada ($K_D \leq 1$ nM) são difíceis de isolar por filtração, uma vez que as condições de eluição necessárias para romper uma interação anticorpo-antígeno muito forte são geralmente duras o suficiente (por exemplo, baixo pH, elevado teor de sal) para desnaturar a partícula de fago de modo a torná-la não-infeccioso. Além disso, o requisito para a imobilização física de um antígeno a uma superfície sólida, produz muitas dificuldades artefactuais. Por exemplo, a alta densidade da superfície do antígeno introduz efeitos de avides que mascaram a verdadeira afinidade. Além disso, a amarra física reduz a translação e rotação de entropia do antígeno, resultando num menor DS de ligação aos anticorpos, resultando numa sobreavaliação da afinidade de ligação em relação ao antígeno solúvel e grandes efeitos de variabilidade nos processos de mistura e de lavagem conduzindo a dificuldades com a reprodutibilidade. Além disso, a presença de apenas um a alguns anticorpos por partícula de fago introduz uma variação estocástica substancial, e a discriminação entre anticorpos de afinidade semelhante torna-se impossível. Por exemplo, as diferenças de afinidade de 6 vezes ou mais são muitas vezes necessárias para a discriminação eficiente (Riechmann e Weill, 93). Finalmente, as populações podem ser ultrapassadas pelo mais rápido crescimento do fago de

tipo selvagem. Em particular, uma vez que o pIII está envolvido diretamente no ciclo de vida do fago, a presença de alguns anticorpos ou antigénios ligados irá prevenir ou retardar a amplificação do fago relacionado.

Vários métodos de visualização da superfície das células bacterianas têm sido desenvolvidos. No entanto, a utilização de um sistema de expressão procariótico, ocasionalmente, introduz desvios de expressão imprevisíveis e camadas de polissacarídeos capsulares bacterianos apresentam uma barreira de difusão que restringe tais sistemas para ligandos de pequenas moléculas (Roberts, 1996). *E. coli* possui uma camada de lipopolissacarídeo ou cápsula que pode interferir estericamente com as reações de ligação macromoleculares. Na verdade, uma função fisiológica presumida da cápsula bacteriana é a restrição da difusão macromolecular para a membrana celular, de modo a proteger a célula do sistema imunitário (Di Rienzo et al., '78). Uma vez que o periplasma de *E. Coli* não evoluiu como um compartimento para a dobra e montagem de fragmentos de anticorpos, a expressão de anticorpos em *E. Coli* tem sido tipicamente muito dependente de clones, com alguns clones expressando bem e outros não de todo. Tal variabilidade introduz preocupações sobre a representação equivalente de todas as sequências possíveis de uma biblioteca de anticorpo expressas na superfície de *E. Coli*.

A descoberta de novas terapêuticas seria facilitada pelo desenvolvimento de sistemas de seleção de levedura. As semelhanças estruturais entre as células B que exibem anticorpos e as células de levedura que apresentam anticorpos fornecem uma analogia mais próxima da maturação de afinidade *in vivo* que está disponível com o fago

filamentoso. Além disso, a facilidade de crescimento da cultura e a facilidade de manipulação genética disponível com a levedura vai permitir que grandes populações sejam mutagenizadas e rastreadas rapidamente. Em contraste com as condições no corpo de um mamífero, as condições físico-químicas de ligação e seleção podem ser alteradas para uma cultura de levedura dentro de uma ampla gama de pH, temperatura e força iônica para proporcionar graus adicionais de liberdade em experiências de manipulação de anticorpos. O desenvolvimento de um sistema de exposição de superfície de levedura para o rastreamento de bibliotecas combinatórias de anticorpos e um rastreamento com base na cinética de dissociação de anticorpo-antígeno foi aqui descrito.

As aplicações potenciais da manipulação de anticorpos monoclonais para o diagnóstico e tratamento da doença humana são de longo alcance. Aplicações para terapia do cancro e imagiologia de tumores em particular, têm sido perseguidas ativamente. Terapias de anticorpos para sépsis Gram-negativa continuam a ser prometedoras, apesar dos resultados preliminares desanimadores. Aplicações *in vitro* à imuno-histoquímica, imunoensaio e cromatografia de imunoafinidade já estão bem desenvolvidas. Para cada uma destas aplicações, os anticorpos com elevada afinidade (isto é, $K_D \leq 10$ nM) e elevada especificidade são desejáveis. A evidência anedótica sugere que sistemas de visualização de fagos ou de exibição bacteriana não são susceptíveis de produzir consistentemente anticorpos de afinidade sub-nanomolar. Até à data, a exibição de levedura irá preencher esta lacuna e, como tal, deve ser uma tecnologia-chave de grande importância comercial e médica.

A importância dos receptores de células T para a imunidade mediada por células é conhecida desde a década de 1980, mas nenhum método para a manipulação de receptores de células T de maior afinidade tem sido desenvolvido. Embora vários grupos produziram construções de receptores de células T de cadeia simples, esses sistemas de expressão têm permitido a análise bioquímica do receptor de ligação de células T, mas não permitiram métodos de biblioteca para alterar estas propriedades de ligação de uma forma dirigida. O receptor de células T tem sido particularmente difícil de produzir na forma solúvel. Na sua forma endógena, que é uma proteína da membrana heterodimérica ($\alpha\beta$) que se associa não covalentemente com as subunidades do complexo CD3 na superfície dos linfócitos T. Os domínios extracelulares α e β são compostos de ambas as regiões constantes ($C\alpha$ e $C\beta$) e regiões variáveis ($V\alpha$ e $V\beta$) que funcionam diretamente na ligação de um antígeno de péptido/MHC. Vários métodos diferentes para a produção têm sido desenvolvidos: a secreção de $V\alpha V\beta$ de *E. coli*, a produção de moléculas quiméricas em células de mieloma que consistem em $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ fundido às regiões constantes de imunoglobulina de cadeia leve k, a produção de $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ em células de timoma por clivagem de uma fusão com os lípidos da superfície celular (Slanetz et al., 1991), clivagem da linha celular de leucemia basofílica de rato produzido o complexo $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ antes da região transmembranar com a digestão da trombina, a produção de $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ em baculovírus infectados de células de insecto, com e sem a associação de fecho de leucina, e a secreção de imunoglobulina C_H-gd em quimeras de TCR a partir de células COS (Eilat et al., 1992). Os fragmentos mais pequenos de TCR de cadeia simples (scTCR) análogos a fragmentos de anticorpos de cadeia simples, que contêm a subunidade de ligação mínima do TCR completo foram construídos e produzidos em *E. Coli* redobrados a partir de

corpos de inclusão ou dobrados no periplasma em níveis de 0,5-1,0 mg/L.

A técnica anterior é deficitária na carência de meios eficazes de exibição da superfície das células de péptidos e proteínas para a seleção de sequências com propriedades de ligação desejáveis. A técnica anterior é também deficiente na falta de meios eficazes de manipulação do receptor de células T para melhoria das propriedades de ligação. Mais especificamente, nenhuma tecnologia se encontra disponível para a manipulação de receptores de células T solúveis para produzir a intervenção terapêutica da imunidade mediada por células. A presente invenção preenche esta necessidade de longa data e desejo nesta técnica.

Boder e Wittrup, 1997 e Kieke et al., 1997 discutem métodos de exibição de superfície celular de levedura.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona um método para a seleção de proteínas com propriedades fenotípicas melhoradas relativos às de um tipo selvagem da referida proteína, compreendendo os passos de:

transformar células de levedura com um vector que expressa uma proteína de fusão a ser testado para uma proteína de parede celular de levedura, em que a mutagénese é utilizada para gerar uma população variada de mutantes da proteína a ser testada;

marcação das referidas células de levedura com um primeiro marcador, em que o referido primeiro marcador se associa

com a levedura expressando a referida proteína a ser testada e não se associa com a levedura que não expressa a referida proteína a ser testada;

isolamento das ditas células de levedura com as quais o dito primeiro marcador está associado;

analisar e comparar as referidas propriedades fenotípicas da referida proteína mutante expressa pela levedura com características fenotípicas de dito proteína do tipo selvagem; e

selecionar as células de levedura que exibem proteínas mutantes com características fenotípicas melhoradas sobre a proteína de tipo selvagem;

onde as propriedades fenotípicas melhoradas são um ou mais de nível de expressão na superfície, estabilidade, níveis de secreção e solubilidade.

Numa forma de realização da presente revelação, é proporcionado um método genético para prender os polipeptídeos à parede da célula de levedura numa forma acessível para ligação de proteína-proteína. Combinando este método com a separação de células ativadas por fluorescência proporciona-se um meio de selecionar proteínas com maior ou menor afinidade para uma outra molécula, especificidade alterada, ou ligação condicional.

Numa outra forma de realização da presente descrição, é proporcionado um método de fusão genética de um polipeptídeo de interesse para o C-terminal da parede celular da proteína de levedura Aga2p. Sob as condições de acoplamento, a parede exterior de cada célula de levedura

contém cerca de 10^4 moléculas de proteínas chamadas aglutininas. As aglutininas servem como contatos específicos para mediar a adesão de células de levedura do tipo de acoplamento oposto durante o acoplamento. Com efeito, a levedura tem evoluído para uma plataforma de ligação proteína-proteína sem impedimento estérico a partir dos componentes da parede celular. Ao ligar-se um anticorpo para a aglutinina, pode-se efetivamente imitar a exposição da superfície celular de anticorpos por células B no sistema imunitário.

Numa outra forma de realização, é proporcionado um método de fusão de uma marca de epítipo de nove resíduos (HA) para o terminal C da proteína AGA2. Este péptido curto está acessível na superfície celular de um anticorpo em solução, sem qualquer fixação ou a digestão das células, e pode ser detectado por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. Assim, a levedura pode ser utilizada para exibir os péptidos.

Em ainda outra forma de realização, é proporcionado um método de fusão de um fragmento scFv do anticorpo monoclonal 4-4-20 ao terminal C da proteína AGA2. Este fragmento é acessível na superfície celular e liga-se ao antígeno de fluoresceína sem qualquer fixação ou digestão das células, e pode ser detectada por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. Assim, a levedura pode ser utilizada para exibir fragmentos de anticorpos.

Um aspecto da presente divulgação fornece um método para a seleção de proteínas com propriedades de ligação desejáveis, compreendendo: transformação de células de

levedura com um vector de expressão de uma proteína a ser testada fundido na sua extremidade do terminal N de uma proteína de ligação da parede celular de levedura; marcação das células de levedura com um primeiro marcador, em que o primeiro marcador se associa com a levedura que expressa a proteína a ser testada e não se associa com a levedura que não expressa a proteína a ser testada; seleção para as células de levedura com as quais o primeiro marcador está associado; e quantificação do primeiro marcador, onde uma elevada ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testada tem propriedades de ligação desejáveis e em que uma baixa ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testada não tem propriedades de ligação desejáveis.

Uma forma de realização preferida da presente revelação inclui ainda os passos de: marcação das células de levedura com um segundo marcador, em que o segundo marcador se associa com a levedura que expressa um marcador de epítopo fundido com a proteína a ser testada e codificado pelo vector e não se associa de levedura que não expressa o marcador de epítopo codificado pelo vector; quantificação do segundo marcador, em que uma ocorrência do segundo marcador indica um número de cópias expressas da proteína marcada com epítopo a ser testado na superfície da célula de levedura; e comparação da quantificação do primeiro marcador com a quantificação do segundo marcador para determinar a ocorrência do primeiro marcador normalizado para a ocorrência do segundo marcador, em que uma maior ocorrência do primeiro marcador em relação à ocorrência do segundo marcador indica que a proteína a ser testada tem propriedades de ligação desejáveis.

Outra forma de realização preferida da presente revelação inclui os passos de: marcação das células de levedura com um terceiro marcador que compete com o primeiro marcador para ligação à proteína a ser testada; marcação das células de levedura com o primeiro marcador; quantificação do primeiro marcador; marcação das células de levedura com o segundo marcador; quantificação do segundo marcador; e comparação da quantificação do primeiro marcador com a quantificação do segundo marcador para determinar a ocorrência do primeiro marcador normalizado para a ocorrência do segundo marcador, em que uma baixa ocorrência do primeiro marcador em relação à ocorrência do segundo marcador indica que a proteína a ser testado tem propriedades de ligação desejáveis.

Em uma forma de realização da presente descrição, o primeiro marcador é um marcador fluorescente ligado a um ligante e o segundo marcador é um marcador fluorescente ligado a um anticorpo. Quando os marcadores são fluorescente, o passo de quantificação é realizada por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência confocal.

Outro aspecto da presente divulgação proporciona um vector para a realização do método da presente invenção, que compreende uma proteína de ligação da parede celular fundida com um terminal N de uma proteína de interesse. As concretizações preferidas deste aspecto da presente divulgação incluem meios para a expressão de um polipeptídeo de epítipo marcado fundido com a proteína de interesse nas células de levedura. Uma forma de realização mais preferida, prevê que a proteína de ligação da parede da célula é a subunidade de ligação de uma proteína

aglutinina de levedura, mesmo mais de preferência a subunidade de ligação da aglutinina de levedura é Aga2p.

Outra forma de realização preferida do presente aspecto da divulgação proporciona que a sequência de aminoácido do epítipo marcado é selecionada a partir do grupo de YPYDVPDYA (HA) (SEQ ID N° 1), EQKLISEEDL (c-myc) (SEQ ID N° 2), DTYRYI (SEQ ID N° 3), TDFYLK (SEQ ID N° 4), EEEEYMPME (SEQ ID N° 5), KPPTPPPEPET (SEQ ID N° 6), HHHHHH (SEQ ID N° 7), RYIRS (SEQ ID N° 8), ou DYKDDDDK (SEQ ID N° 9), e de que o terminal N da proteína de interesse é fundido com um terminal C da proteína de ligação à parede celular.

Na presente invenção, é proporcionado um método para a seleção de proteínas com propriedades fenotípicas melhoradas relativos aos da proteína de tipo selvagem, compreendendo os passos de: transformação de células de levedura com um vector de expressão de uma proteína a ser testada fundido com uma parede celular de proteína de levedura, em que a mutagénese é utilizada para gerar uma população variada de mutantes da proteína a ser testada; marcação das células de levedura com um primeiro marcador, em que o primeiro marcador se associa com a levedura que expressa a proteína a ser testada e não se associa com a levedura que não expressa a proteína a ser testada; isolar as células de levedura com as quais o primeiro marcador está associado; e análise e comparação das propriedades da proteína mutante expressas por leveduras com propriedades da proteína de tipo selvagem, em que são selecionadas as células de levedura que exibem proteínas mutantes com propriedades melhoradas através da proteína de tipo selvagem. Como descrito acima, um segundo e/ou terceiro marcador pode ser empregue com esta forma de realização, e

a seleção de proteínas mutantes de interesse com propriedades fenotípicas melhoradas podem envolver ciclos iterativos dos passos de enriquecimento e de marcação.

Em concretizações preferidas, a proteína de parede celular de levedura é uma aglutinina; a proteína a ser testada é fundida pelo seu terminal N para o terminal C de uma subunidade de ligação de uma aglutinina; a estirpe de levedura é de um género selecionado a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* e *Candida*; a proteína a ser testado é um anticorpo, fragmento de anticorpo Fab, Fv ou scFv, mais preferencialmente a proteína a ser testada é o domínio de ligação ao ligando de um receptor da superfície celular, mesmo mais preferencialmente o receptor da superfície celular é um receptor de células T.

Um objecto da presente invenção é proporcionar um método de escolha para as proteínas mutantes que exibem propriedades fenotípicas melhoradas selecionadas a partir do grupo consistindo em expressão de superfície, estabilidade, nível de secreção, e solubilidade, em que os mutantes da proteína a ser testada podem conter mutações únicas ou várias mutações.

Em ainda outra forma de realização, pode ser usado um segundo marcador para determinar quantitativamente os níveis de expressão de superfície celular, que podem ser utilizados como um ensaio para selecionar outras características fenotípicas desejáveis, tais como a

expressão intracelular, estabilidade, constante de ligação, constante de dissociação, nível de secreção e solubilidade.

Numa outra forma de realização, as proteínas mutantes selecionadas pelos métodos da presente invenção podem ser ainda caracterizadas por clonagem do gene que codifica as proteínas mutantes selecionadas num vector adaptado para expressão numa célula eucariótica; e que expressam a proteína mutante na eucariótica, em que as propriedades melhoradas da proteína mutante são confirmadas por comparação das propriedades fenotípicas das propriedades melhoradas da proteína mutante com as propriedades da proteína de tipo selvagem. De preferência, a célula eucariótica é selecionada do grupo que consiste em mamíferos, insectos, ou levedura. Uma vez que o fenótipo do mutante selecionado é uma propriedade intrínseca da "nova" (isto é, mutante) de proteína, esta abordagem é também aplicável para a expressão do mutante em outros sistemas de expressão não eucarióticos.

A exposição da superfície de levedura e triagem por citometria de fluxo foram usados para isolar os mutantes de um scFv que é específico para a região Vb8 do receptor de células T. A seleção foi baseada na ligação de equilíbrio por duas sondas fluorescentemente marcadas, um domínio Vb8 solúvel e um anticorpo para o marcador epitópico de c-myc presente no terminal carboxilo do scFv. Os mutantes que foram selecionados nesta exibição incluem um scFv com três vezes maior afinidade com os clones Vb8 e scFv que foram ligados com afinidades reduzidas pelo anticorpo anti-c-myc. Este último resultado indica que o sistema de exibição de levedura pode ser utilizado para mapear os epítomos conformacionais, que não podem ser revelados por exibição

de péptidos padrão. As constantes de ligação de equilíbrio de antígeno foram estimadas dentro do formato de exibição de superfície, permitindo o rastreio de mutantes isolados sem necessidade de subclonagem e expressão solúvel. Apenas uma relativamente pequena biblioteca de células de levedura (3×10^5) exibindo aleatoriamente scFv mutagenizado foi rastreada para identificar esses mutantes, indicando que este sistema irá fornecer uma ferramenta poderosa para a manipulação das propriedades de ligação de eucarióticas segregadas e proteínas da superfície celular.

Outra forma de realização preferida do presente aspecto da invenção proporciona um método para a exibição de proteínas que não são apresentadas como a sua sequência normal ("tipo selvagem"). No exemplo mostrado, o receptor da célula T para o antígeno não foi expressa como a sua sequência de "tipo selvagem". No entanto, após a mutagênese aleatória e seleção por citometria de fluxo com anticorpos específicos da conformação apropriada, os receptores mutantes foram expressos na superfície da célula de levedura. Esta estratégia permitirá a descoberta de novos receptores de células T e proporcionará um método para a visualização de virtualmente qualquer polipeptídeo. Assim, a presente invenção também fornece um método para a seleção de proteínas para exibição na superfície de uma célula de levedura, compreendendo a etapa de: transformação de células de levedura com um vector que expressa uma proteína a ser testada fundida com uma proteína de parede celular de levedura, em que a mutagênese é utilizada para um gerar uma população variada de mutantes da proteína a ser testada; marcação das células de levedura com um primeiro marcador, em que o primeiro marcador se associa com a levedura expressando a proteína a ser testada e não se associa com a

levedura que não expressa a proteína a ser testada; isolar as células de levedura com as quais o primeiro marcador está associado, quantificando o primeiro marcador, em que uma maior ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testada tem propriedades de visualização desejáveis, e em que uma baixa ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testada não tem propriedades de exibição desejáveis. De preferência, a proteína testada é um anticorpo, fragmento de anticorpo Fab, Fv, ou scFv ou o domínio de ligação ao ligando de um receptor da superfície celular. Um exemplo representativo de um receptor da superfície celular é um receptor de células T.

Outros e adicionais aspectos, características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição das formas de realização presentemente preferidas da invenção dadas com o propósito de divulgação.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

De modo que a matéria na qual as características acima citadas, vantagens e objetos da invenção são alcançados e podem ser compreendidos em detalhe, descrições mais particulares da invenção podem ser obtidas por referência a certas formas de realização da mesma que são ilustradas nos desenhos anexos. Estes desenhos formam uma parte da descrição. É de notar que os desenhos anexos ilustram realizações preferidas da invenção e, portanto, não são para ser considerados como limitativos no seu âmbito.

A **Figura 1** é um diagrama esquemático, que mostra a maturação de afinidade *in vitro* por exibição de levedura.

A **Figura 2** mostra a representação esquemática de exposição de superfície em leveduras. Um péptido do epítipo de nove aminoácidos do antigénio hemaglutinina (HA) foi fundido com o terminal C da subunidade Aga2p de α -aglutinina, seguido pela sequência de scFv anti-fluoresceína 4-4-20. Uma marcação de dez resíduos de epítipo adicional (c-myc) foi fundido ao terminal C do scFv, permitindo a quantificação da exibição da fusão independente da ligação ao antigénio, quer pela HA ou marcações de c-myc. O marcador de HA ou de c-myc pode ser usado para normalizar as variações do número de proteínas de fusão exibidas na citometria de fluxo do marcador duplo.

A **Figura 3** mostra um vector de exibição de superfície de levedura. A **Figura 3A** mostra a construção do vector pCT202. A **Figura 3B** mostra os locais de restrição específicos e a regulação da transcrição por galactose, marcações do epítipo c-myc do terminal N HA e terminal C e o sítio de clivagem de protease do Factor Xa.

A **Figura 4** demonstra que as fusões exibidas podem ser detectadas por técnicas de fluorescência, que mostram um histograma de citometria de fluxo de levedura marcado com α -c-myc/a-rato-PE.

A **Figura 5** mostra que a ligação ao antigénio por 4-4-20 scFv pode ser detectada por fluorescência, que mostra um histograma de citometria de fluxo de levedura marcado com FITC-dextrano (2×10^6 Da).

A **Figura 6** mostra que a atividade de 4-4-20 e c-myc pode ser detectado em simultâneo, e demonstram uma correlação 1:1 de sinais de fluorescência; por conseguinte, a variação na intensidade de sinal 1 (FITC), pode ser normalizada para

a variação da célula-a-célula na expressão da proteína de interesse com a intensidade de sinal 2 (PE).

A **Figura 7** mostra a sequência de cassete do gene AGA2-HA-4-4-20-c-myc.

A **Figura 8** mostra imagens microscópicas confocais de leveduras exibindo scFv. A levedura contendo o plasmídeo que dirige a expressão de superfície do péptido HA (**Figura 8A**) ou a fusão scFv (**Figura 8B**) foram marcadas com mAb 9E10, seguido conjugado de IgG-R-ficoeritrina anti-rato secundária (PE) e FITC-dextrano. Foram recolhidas imagens DIC (painéis superiores), fluorescência vermelha PE (painéis centrais) e fluorescência verde FITC (painéis inferiores).

A **Figura 9** mostra análises de citometria de fluxo de leveduras exibindo scFv. As estirpes de leveduras que apresentam ou (**Figura 9A**) um péptido irrelevante ou (**Figura 9B**), o 4-4-20 scFv foram marcadas com mAb 9E10 e FITC-dextrano. As células que exibem scFv também foram tratadas com 5 mM de DTT antes da marcação (**Figura 9C**). (i) histogramas univariados de fluorescência PE associada à marcação por 9E10; (ii) histogramas univariados de fluorescência FITC; (iii) histogramas bidimensionais mostrando a correlação entre PE e FITC.

A **Figura 10** demonstra o enriquecimento de leveduras exibindo variantes scFv melhoradas por seleção cinética e citometria de fluxo de separação de células. A levedura que expressa uma biblioteca mutagenizada 4-4-20 scFv (**Figura 10A**) e um conjunto de levedura resultante de três ciclos de seleção e amplificação cinética (**Figura 10B**) foram submetidos a dissociação competitiva do antigénio fluorescente com 5-aminofluoresceína, deixando as células

exibir os mutantes de ligação mais apertados com a maior proporção de intensidade FITC/intensidade PE.

A **Figura 11** mostra a dissociação cinética da interação entre a fluoresceína e a superfície de exibição scFv. A levedura exibindo 4-4-20 scFv (círculos), mutante 4M1.1 (quadrados), isolado a partir da biblioteca, e mutantes 4M1,2 (triângulos) foi marcada com Mab 9E10 e FITC-dextrano. 5-aminofluoresceína foi adicionada como um competidor. A média de intensidade de fluorescência FITC da população de células positiva 9E10 foi seguida como uma função de tempo. O declive da linha é igual à taxa de dissociação cinética, e o valor extrapolado no tempo $t = 0$ seg é igual à valência da interação. IMF_i = intensidade relativa de fluorescência média de levedura no tempo $t = i$.

A **Figura 12** mostra os níveis de expressão e as propriedades de ligação do antígeno de exibição da superfície de levedura scFv-KJ16 (sombreado) e controle Aga2p/HA (não sombreado). A estirpe de levedura EBY100 foi transformada com o scFv-KJ16 clonado no vector de exibição de levedura pCT202 ou o vector pCT202 isolado. Após a indução de galactose em meio a 20°C durante a noite, as células foram coradas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. **(Figura 12A)** scFv-KJ16/levedura ou Aga2p/HA/yeast coradas com anticorpo de ratinho anti-HA Mab (12CA5) seguido pelo IgG anti-ratinho de cabra marcado com FITC **(Figura 12B)** scFv-KJ16/levedura ou Aga2p/HA/levedura coradas com rato anti-c-myc Mab (9E10), seguido de IgG anti-ratinho de cabra marcado com FITC, **(Figura 12C)** scFv-KJ16/levedura ou Aga2p/HA/levedura coradas com scTCR biotinalado a ~10 nM, seguido por um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, e **(Figura 12D)** scFv-KJ16/levedura coradas com scTCR biotinilado seguido por um conjugado de streptavidina-ficoeritrina na presença

(sombreado) ou ausência (não sombreado) de IgG KJ intacta 16 a 100 mg/ml.

A **Figura 13** mostra a isotérmica de ligação de equilíbrio ao antígeno da parede celular exibida scFv-KJ16, determinada por citometria de fluxo. A estirpe de levedura EBY100 exibindo a superfície scFv-KJ16 foi incubada com concentrações variáveis de scTCR biotinilado, marcado com um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, e detectado por citometria de fluxo. Os dados foram representados como um diagrama de Scatchard ou como uma titulação (inserção) e foi determinada uma efetiva K_D ~500 nm. MFU refere-se à média das unidades de fluorescência.

A **Figura 14** mostra os dois histogramas de fluorescência dimensionais e janela de classificação utilizada para selecionar mutantes scFv-KJ16. scFv-KJ16 clonado no vector de exibição pCT202 foi transformado na estirpe mutante de *E. coli* XL1-Red (Stratagene) e propagado por seis ciclos de crescimento durante a noite. Os plasmídeos da biblioteca mutante foram purificados e usados na transformação de LiAc (Gietz et al., 1995) da levedura EBY100. Após a indução a 30°C, as leveduras foram classificadas usando um classificador de células ativadas por fluorescência. **(Figura 14A)**. Histograma representativas da primeira fase de separação de células, com a janela de triagem indicada, e **(Figura 14B)** histograma representativo desde a quarta (última) ronda de classificação, ilustrando um enriquecimento da população na janela de classificação.

A **Figura 15** mostra os níveis médios de ligação de anti-HA Mab, anti-c-myc Mab, ou scTCR biotinilado durante dez clones selecionados aleatoriamente a partir do tipo final mostrado na Figura 14B. Dez mutantes e peso scFv-KJ16/levedura foram induzidos em meio de galactose a 30°C

durante a noite. As células foram analisadas por citometria de fluxo, após coloração com anticorpo de ratinho anti-HA MAb seguido por IgG anti-ratinho de cabra marcado com FITC (barras abertas), ratinho anti-c-myc, seguido de IgG anti-ratinho de cabra marcado com FITC (barras cinzentas), ou scTCR biotinilado de ~40 nM, seguido por um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (barras pretas).

A **Figura 16** mostra a distribuição de marcadores fluorescentes para a ligação de anti-c-myc ou scTCR de três mutantes selecionados mostrados na Figura 4. Três classes de mutantes scFv-KJ16/levedura foram duplamente coradas com anti-c-myc e scTCR biotinilado seguido de IgG anti-ratinho de cabra marcado com FITC e um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, em seguida, analisadas por citometria de fluxo, tal como descrito na Figura 4. As distribuições fluorescentes para cada mutante scFv-KJ16/levedura (sombreado) e em peso scFv-KJ16/levedura (sombreado) são mostradas. **Figuras 16A e 16B**, Mut4; **Figuras 16C e 16D**, mut7; **Figuras 16E e 16F**, mut10.

A **Figura 17** mostra as isotérmicas de equilíbrio de ligação ao antígeno para três mutantes mostrados na Figura 16. Aga2p/HA/levedura, em peso scFv-KJ16/levedura, e três scFv-mutantes KJ16/levedura caracterizados na Figura 16, foram coradas com várias diluições de scTCR biotinilado seguidos por um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina. Após a análise por citometria de fluxo, as isotérmicas de ligação foram representados graficamente com MFU em função da diluição scTCR.

A **Figura 18** mostra a análise da sequência do tipo selvagem de scFv-KJ16, Mut4, e mut7. Os plasmídeos de peso scFv-KJ16/levedura e dois mutantes (e Mut4 mut7) foram

recuperados através de resgate de plasmídeo e transformados em células competentes de *E. coli* DH5a para produzir plasmídeos para sequenciação, como descrito abaixo. A análise de sequência foi realizada utilizando iniciadores que flanqueiam o scFv do vector de exibição. As mutações são indicadas a negrito.

A **Figura 19** mostra o perfil de citometria de fluxo do anticorpo que se liga a levedura que foi transformada com um plasmídeo que contém um gene receptor de células T de cadeia simples ($V\alpha V\beta$). A sequência de tipo normal ou selvagem (wt) é comparada com vários mutantes (mTCR7, TCR15, TCR16) que foram selecionados após mutagênese aleatória do plasmídeo scTCR. A seleção envolveu a ligação do anticorpo 1B2, que reconhece um epítopo conformacional no receptor de células T, seguido de várias rondas de triagem de células fluorescentes ativadas. No primeiro painel, as células de levedura foram coradas com um anticorpo (12CA5) para o marcador HA. No segundo painel, as células de levedura foram coradas com um anticorpo (1B2) para o receptor das células T. Embora o epítopo HA seja expresso sobre a superfície, em cada caso, apenas as células que expressam um plasmídeo mutagenizado são capazes de expressar o receptor de células T nativas (1B2 positivo).

A **Figura 20** mostra o perfil de citometria de fluxo do anticorpo que se liga a levedura que foi transformada com mutantes duplos da seleção mostrada na Figura 19. As células foram coradas para citometria de fluxo, tal como descrito na Figura 19. Os mutantes duplos expressam um aumento no nível do receptor de células T (isto é, material reativo de 1B2). Os resultados mostram que, ao combinar mutações pontuais, é possível aumentar o nível de expressão na superfície celular do receptor de células T.

A **Figura 21** mostra a sequência de mutações que levam a uma maior expressão do receptor de células T na superfície celular. Estes incluíram os resíduos 17 do V β , 43 do V α , e 104 do V α .

A **Figura 22** mostra os níveis de secreções relativas de scTCR. Níveis de expressão solúveis (unidades arbitrárias) de scTCR produzidos usando o sistema de baixa cópia de expressão de levedura. Culturas em triplicado a partir de clones independentes foram analisadas para a atividade 1B2 ELISA.

A **Figura 23A** mostra o fluxo de histogramas de scTCR exibindo a levedura. São apresentadas as populações de células classificadas para as do tipo selvagem e único representante, mutantes duplos, e triplos. As unidades de fluorescência média (FITC fluorescência: anti-HA, fluorescência PE: 1B2) são indicadas em cada histograma. Anti-HA indica o número de fusões de superfície, e 1B2 indica o número de células que apresentem scTCR corretamente dobrado. A **Figura 23B** mostra a correlação entre a expressão de superfície e a secreção solúvel. ScTCR de superfície 1B2 ativo determinada por fluxo é comparada com a atividade de 1B2 de material solúvel segregado por ensaio de ELISA. No mínimo, as experiências de fluxo em duplicado foram realizadas para determinar as unidades de fluorescência média de um clone específico.

A **Figura 24A** mostra as estabilidades temperatura de scTCR. As amostras de sobrenadante de levedura contendo scTCR foram submetidas às temperaturas indicadas, durante uma hora. Amostras em triplicado foram analisadas para frações 1B2 ativas por ELISA. As frações foram normalizadas de forma independente para a unidade pela maior intensidade de sinal de ELISA com nenhuma perda de atividade. A **Figura 24B**

mostra a cinética de desnaturação térmica de scTCR. A atividade 1B2 ELISA de amostras de sobrenadante foi monitorizada como uma função do tempo que cada amostra foi incubada a 46°C. São indicadas taxas cinéticas de desnaturação térmica observadas (k_{obs}) a 46°C. Em ambas as **Figura 24A** e **24B**, são feitas comparações para TRX-TCR em vez do scTCR de tipo selvagem, pois o tipo selvagem de scTCR não foi detectado em sobrenadantes de levedura.

A **Figura 25** mostra a correlação entre a estabilidade térmica e a expressão solúvel. A atividade scTCR 1B2 ELISA remanescente depois de ter sido incubada a 48°C durante uma hora, é comparado com os níveis de secreção relativos (1B2 ELISA). Amostras em triplicado foram analisadas para os níveis de secreção e para analisar a desnaturação térmica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Tal como aqui utilizado, o termo "maturação de afinidade" refere-se a um processo de mutação e seleção sucessiva pela qual os anticorpos de maior afinidade são selecionados. Tal como aqui utilizado, o termo "aglutinina" deve referir-se a uma proteína de adesão da superfície de levedura que se liga a duas células de levedura em conjunto durante o acoplamento. Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína produzida por sistemas imunitários de mamíferos, que se liga fortemente e especificamente a moléculas específicas. Tal como aqui utilizado, o termo "ligando" refere-se a uma molécula que é ligada especificamente a uma proteína específica. Tal como aqui utilizado, o termo "antigénio" refere-se a um ligando que está ligado especificamente a um anticorpo. Tal como aqui utilizado, o termo "região determinante de complementaridade" ou "CDR" refere-se à porção de um anticorpo que contacta diretamente com o antigénio ligado.

Tal como aqui utilizado, o termo "separação de células ativadas por fluorescência" ou "citometria de fluxo" refere-se a um método para a triagem de populações de células com base na marcação fluorescente diferencial. Tal como aqui utilizado, o termo "hapteno" refere-se a um antígeno pequeno que não pode estimular uma resposta imunitária sem ser conjugado com um transportador. Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo de cadeia única" ou "SCA" deve referir-se a uma fusão de porções de cadeias pesadas e leves de um anticorpo que retém um único local de ligação ativa. O termo scFv é utilizado para se referir a um anticorpo de cadeia simples. Tal como aqui utilizado, o termo "epítipo marcador" refere-se a uma sequência contígua de aminoácidos ligados especificamente por um anticorpo quando fundido a uma outra proteína. Tal como aqui utilizado, o termo "HA" refere-se à sequência de marcador epitópico YPYDVPDYA (SEQ ID N° 1). Tal como aqui utilizado, o termo "c-myc" refere-se à sequência de marcador epitópico EQKLISEEDL (SEQ ID N° 2). Tal como aqui utilizado, o termo "scFv 4-4-20" refere-se a um scFv que se liga especificamente à fluoresceína e fluoresceína conjugada a outras moléculas, tais como biotina ou dextrano. Tal como aqui utilizado, o termo "AGA2p" refere-se ao produto de proteína de levedura do tipo AGA2 de acoplamento de um gene de aglutinina. O termo "exibição" será usado para descrever uma combinação de características biofísicas, permitindo uma proteína escapar do aparelho de "controle de qualidade" secretor que mantém e degrada proteínas deformadas (Hammond & Helenius, 1995). Proteínas exibidas na superfície da célula de levedura devem primeiro passar com sucesso pelo passo de controle de qualidade. Cinética de enrolamento de proteínas e de estabilidade termodinâmica juntos são acreditados determinar a eficiência de escape do aparelho de controle de qualidade.

De acordo com a presente invenção, pode ser empregue a biologia molecular convencional, microbiologia, e técnicas de ADN recombinante dentro da perícia na técnica. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura. Veja-se, por exemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); "ADN Cloning: A Practical Approach", Volumes I e II (DN Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (MJ Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (BD Hames & SJ Higgins eds. (1985)); "Transcription and Translation" (BD Hames & SJ Higgins eds. (1984)); "Animal Cell Culture" (RI Freshney, ed. (1986)); "Immobilized Cells and Enzymes" (IRL Press, (1986)); B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984).

Um "vector" é um replicação, tal como o plasmídeo, fago ou cosmídeo, ao qual outro segmento de ADN pode ser ligado de forma a provocar a replicação do segmento ligado.

Uma "sequência que codifica" ADN é uma sequência de ADN de cadeia dupla que é transcrita e traduzida num polipeptídeo *in vivo* quando colocada sob o controlo de sequências reguladoras apropriadas. Os limites da sequência de codificação são determinados por um códão de início no terminal 5' (amino) e um códão de terminação da tradução no terminal 3' (carboxilo). Uma sequência de codificação pode incluir sequências procarióticas, cADN de mRNA eucariótico, sequências de ADN genómico a partir de ADN eucariótico (por exemplo, mamíferos), e mesmo sequências de ADN sintéticas. Um sinal de poliadenilação e sequência de terminação da transcrição estará normalmente localizado a 3' da sequência de codificação.

Sequências de controlo transcricional e de tradução são sequências reguladoras de ADN, tais como promotores, potenciadores, sinais de poliadenilação, terminadores e semelhantes, que proporcionam a expressão de uma sequência de codificação numa célula hospedeira.

Uma "sequência promotora" é uma região reguladora de ADN capaz de ligar a polimerase de ARN numa célula e iniciar a transcrição de uma sequência de codificação a jusante (direção 3'). Para efeitos de definição da presente invenção, a sequência promotora está delimitada no seu terminal 3' pelo local de iniciação da transcrição e prolonga-se a montante (direção 5') para incluir o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar a transcrição a níveis detectáveis acima do fundo. Dentro da sequência promotora será encontrado um local de iniciação da transcrição (convenientemente definido através de mapeamento com nuclease S1), bem como domínios de ligação de proteínas (sequências de consenso) responsáveis pela ligação da polimerase de ARN. Promotores eucarióticos, muitas vezes, mas não sempre, contêm caixas "TATA" e caixas "CAT". Os promotores procarióticos contêm sequências de Shine-Dalgarno em adição a -10 e -35 sequências de consenso.

Uma "sequência de controlo de expressão" é uma sequência de ADN que controla e regula a transcrição e tradução de outra sequência de ADN. Uma sequência de codificação está "sob o controlo" das sequências de controlo de transcrição e tradução numa célula quando a polimerase de ARN transcreve a sequência codificante em mARN, que é então traduzida na proteína codificada pela sequência de codificação.

Um "gene de seleção" refere-se a um gene que permite a discriminação de células exibindo um fenótipo determinado aquando da implementação de certas condições. Por exemplo, o crescimento de bactérias em meio contendo antibióticos para selecionar as células bacterianas contendo genes de resistência a antibióticos.

O termo "iniciador" como aqui usado refere-se a um oligonucleótido, quer ocorra naturalmente como numa digestão de restrição purificada ou produzido sinteticamente, que é capaz de atuar como um ponto de iniciação da síntese quando colocado sob condições nas quais a síntese de um produto de extensão do iniciador, que é complementar a uma cadeia de ácido nucleico, é induzida, isto é, na presença de nucleótidos e de um agente indutor tal como uma polimerase de ADN e a uma temperatura e pH adequado. O iniciador pode ser de cadeia simples ou de cadeia dupla e tem de ser suficientemente longo para iniciar a síntese do produto de extensão desejado na presença do agente indutor. O comprimento exato do iniciador irá depender de muitos factores, incluindo a temperatura, a fonte do iniciador e o método utilizado. Por exemplo, para aplicações de diagnóstico, dependendo da complexidade da sequência alvo, o iniciador de oligonucleótido tipicamente contém 15-25 ou mais nucleótidos, embora possa conter menos nucleótidos.

Os iniciadores aqui são selecionados para serem "substancialmente" complementares às diferentes cadeias de uma sequência de ADN alvo particular. Isto significa que os iniciadores devem ser suficientemente complementares para hibridar com as suas respectivas cadeias. Portanto, a sequência iniciadora não precisa de refletir a sequência

exata do modelo. Por exemplo, um fragmento de nucleotídeo não complementar pode estar ligado à extremidade 5' do iniciador, sendo o restante da sequência do iniciador complementar à cadeia. Alternativamente, bases não-complementares ou sequências mais longas podem ser intercaladas no iniciador, desde que a sequência de iniciador tenha complementaridade suficiente com a sequência ou vá hibridar com a mesma e, assim, formar o modelo para a síntese do produto de extensão.

Uma célula foi "transformada" por ADN exógeno ou heterólogo quando esse ADN foi introduzido dentro da célula. O ADN transformador pode ou não ser integrado (ligado covalentemente) no genoma da célula. Em procariotas, leveduras e células de mamíferos, por exemplo, o ADN transformante pode ser mantido num elemento episomal, tal como um plasmídeo. No que diz respeito às células eucarióticas, uma célula transformada de forma estável é aquela em que o ADN transformante se tornou integrado num cromossoma de modo a que seja herdado pelas células filhas através da replicação do cromossoma. Esta estabilidade é demonstrada pela capacidade da célula eucariótica para estabelecer linhas celulares ou clones constituídos por uma população de células filhas contendo o ADN transformante. Um "clone" é uma população de células derivadas de uma única célula ou ancestral comum por mitose. Uma "linha de células" é um clone de uma célula primária que é capaz de crescimento estável *in vitro* durante muitas gerações.

Uma região "heteróloga" da construção de ADN é um segmento identificável de ADN dentro de uma molécula de ADN maior, que não é encontrado em associação com a molécula maior na natureza. Assim, quando a região heteróloga codifica um

gene de mamífero, o gene será normalmente flanqueado por ADN que não flanqueia o ADN genómico de mamífero no genoma do organismo fonte. Em outro exemplo, a sequência de codificação é uma construção onde a própria sequência de codificação não se encontra na natureza (por exemplo, um cADN onde a sequência de codificação genómica contém intrões, ou sequências sintéticas possuindo códãos diferentes dos do gene nativo). As variações alélicas que ocorrem naturalmente, ou eventos mutacionais não dão origem a uma região heteróloga de ADN, tal como aqui definida.

Um certo número de sequências polipeptídicas que podem ser fundidas a proteínas e ligadas especificamente por anticorpos são conhecidos e podem ser utilizados como marcadores de epítipo. Estes incluem, por exemplo, HA (SEQ ID N° 1), c-myc (SEQ ID N° 2), DTYRYI (SEQ ID N° 3), TDFYLK (SEQ ID N° 4), EEEEEYMPME (SEQ ID N° 5), KPPTPPPEPET (SEQ ID N° 6), HHHHHH (SEQ ID N° 7), RYIRS (SEQ ID N° 8), e DYKDDDDK (SEQ ID N° 9).

Os anticorpos são moléculas proteicas produzidas pelo sistema imunológico humano para reconhecer, ligar-se, e mediar a eliminação de substâncias estranhas ao corpo. Tecnologias foram desenvolvidas para tirar proveito de anticorpos para o diagnóstico de cancro altamente específico e terapia. Por exemplo, por radioisótopos amarrados ou toxinas para um anticorpo que se liga às células tumorais, é possível fornecer uma dose concentrada de tais agentes que matam as células ao tecido doente, enquanto deixam o tecido circundante relativamente incólume. Os anticorpos também são ferramentas essenciais na área de biotecnologia, e são amplamente utilizados para fins de análise, por exemplo, para quantificar traços de

substâncias e separações, e purificar produtos biológicos desejados a partir de misturas complexas.

Nestas aplicações, tanto a resistência da ligação do anticorpo com o seu alvo (afinidade) e a seletividade com a qual um anticorpo se liga apenas ao seu alvo em particular (especificidade) são cruciais. Por esta razão, a manipulação de proteínas procura alterar e melhorar as características de ligação dos anticorpos específicos. Abordagens racionais para a concepção estrutural anticorpo tiveram um sucesso limitado, e os métodos disponíveis para a seleção aleatória possuem limitações significativas.

A abordagem do sistema imunitário dos mamíferos para o problema do ajuste fino da afinidade dos anticorpos é por um processo chamado de "maturação de afinidade", em que os ciclos de mutação e seleção evolutiva produzem anticorpos que se ligam aos seus alvos mais firmemente. A presente divulgação proporciona um novo e poderoso sistema para a afinidade e especificidade de anticorpos manipulados, pela construção de um análogo microbiano do repertório de células B do sistema imunitário dos mamíferos. Os anticorpos foram exibidos na superfície de células de levedura por fusão genética com proteínas da parede celular. Depois de mutação, as variantes foram selecionadas com base na melhoria das características de ligação com alvos fluorescentes marcados.

O método de exibição de anticorpos levedura foi testado pelo estudo de anticorpos modelo cujas propriedades físicas e químicas já estão bem caracterizadas. Estes métodos são, em seguida, aplicados diretamente a anticorpos de interesse

prático. A maleabilidade genética da levedura, a facilidade de crescimento deste micróbio, e a capacidade de modificar as condições de ligação do anticorpo no tubo de ensaio combinam-se para produzir um controle sem precedentes sobre a manipulação da afinidade e especificidade de anticorpos.

A vantagem do método da biblioteca da presente divulgação é que é particularmente adequado para proteínas, tais como anticorpos. O método mais amplamente usado atualmente consiste em "filtração" para anticorpos exibidos na superfície do bacteriófago. A exibição de levedura tem várias vantagens sobre exibição em fagos. Em primeiro lugar, a ligação antígeno-anticorpo não precisa ser quebrada para recuperar variantes firmemente ligadas. As duras condições necessárias para romper este vínculo em métodos anteriores podem reduzir a infectividade do fago. Em segundo lugar, o aumento da diversidade da biblioteca devido à diminuição da supressão clonal é uma vantagem. É bem sabido que muitas estruturas de anticorpo não podem ser processadas corretamente pelo aparelho de secreção bacteriana. As células de levedura são eucarióticas e possuem vias secretoras muito semelhantes às células de mamíferos. Em terceiro lugar, a presente divulgação proporciona uma determinação mais exata e precisa da afinidade anticorpo-antígeno. A presença de 10^4 moléculas por célula elimina a variação estocástica o resulta com apenas algumas moléculas por fago. Finalmente, a quantificação de fluorescência por citometria de fluxo proporciona uma medição contínua do antígeno ligado à superfície, sem um conhecimento *a priori* da afinidade em comparação com o binário da dicotomia ligado/libertado com filtração de fago. Além disso, as bactérias possuem uma camada de lipopolissacarídeo, que atua como uma barreira de

permeabilidade macromolecular que impede o acesso do anticorpo ou proteína às moléculas exibidas.

A presente divulgação proporciona um sistema de exibição de superfície para a expressão e seleção *in vitro* de bibliotecas de péptidos e proteínas em leveduras. Um epítopo do péptido de nove resíduos (HA) foi fundido com a subunidade de ligação de uma proteína de parede celular de levedura (AGA2), seguindo-se Fv de cadeia simples 4-4-20 anti-fluoresceína. A seleção foi realizada por citometria de fluxo de misturas de células com e sem a fusão exibida. Os enriquecimentos de 600 vezes foram alcançados num passe de classificação. O sistema da presente divulgação ilustra um processo para a maturação da afinidade *in vitro*, de anticorpos, bem como um processo para a evolução dirigida de outras proteínas e péptidos, com as vantagens de (i) um esquema de selecção de fluxo de citometria de marcação dupla permitindo uma discriminação de afinidade fina em vez de filtração; (ii) até 10^4 cópias da sequência exibida por célula, eliminando variações estocásticas na seleção; e (iii) a expressão biblioteca em leveduras, com uma expressão alterada ou potencialmente melhorada, o que poderia produzir clones que seriam excluídos de uma biblioteca expressa em *E. coli*.

Um objecto da presente divulgação representa a manipulação de anticorpos para melhorar a afinidade e especificidade. Para este fim, a ligação do anticorpo-hapteno foi estudada através de mutagénese e rastreio de anticorpos expressos sobre a parede celular externa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Como um eucariótico experimentalmente fácil e geneticamente maleável, a levedura apresenta vantagens significativas em relação à exibição de fagos filamentosos

como uma plataforma para expressão de anticorpos e manipulação. Em essência, um análogo microbiano do repertório de células B do sistema imunitário de mamífero foi construído *in vitro*, permitindo a maturação da afinidade do anticorpo ser realizada sob condições rigorosamente controladas de mutagênese e seleção. Como resultado, foram atingidos anticorpos com afinidade e especificidade significativamente melhorada.

Um aspecto da presente divulgação fornece um método para a seleção de proteínas com propriedades de ligação desejáveis, compreendendo: transformação de células de levedura com um vector de expressão de uma proteína para ser testado fundida na sua extremidade do terminal N de uma proteína de ligação da parede celular de levedura; marcação das células de levedura com um primeiro marcador, em que o primeiro marcador se associa com a levedura que expressa a proteína a ser testada e não se associa com a levedura que não expressa a proteína a ser testada; seleção das células de levedura com o qual o primeiro marcador está associado; quantificação do primeiro marcador em que uma elevada ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testado tem propriedades de ligação desejáveis e em que uma baixa ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testado não tem propriedades de ligação desejáveis.

Uma forma de realização preferida da presente revelação inclui ainda os passos de: marcação das células de levedura com um segundo marcador, em que o segundo marcador se associa com a levedura que expressa um marcador de epítopo fundido com a proteína a ser testado e codificado pelo vector e não se associa com levedura que não expressa o marcador de epítopo codificado pelo vector; quantificação

do segundo marcador, em que a ocorrência do segundo marcador indica um número de cópias expressas da proteína marcada com epítipo a ser testado na superfície da célula de levedura; e comparação da quantificação do primeiro marcador com a quantificação do segundo marcador para determinar a ocorrência do primeiro marcador normalizado para a ocorrência do segundo marcador, em que uma maior ocorrência do primeiro marcador em relação à ocorrência do segundo marcador indica que a proteína a ser testado possui propriedades de ligação desejáveis.

Outra forma de realização preferida da presente revelação inclui os passos de: marcação das células de levedura com um terceiro marcador que compete com o primeiro marcador para ligação à proteína a ser testada; marcação das células de levedura com o primeiro marcador; quantificação do primeiro marcador; marcação das células de levedura com o segundo marcador; quantificação do segundo marcador; e comparação da quantificação do primeiro marcador com a quantificação do segundo marcador para determinar a ocorrência do primeiro marcador normalizado para a ocorrência do segundo marcador, em que uma baixa ocorrência do primeiro marcador em relação à ocorrência do segundo marcador indica que a proteína a ser testada tem propriedades de ligação desejáveis.

Outro aspecto da presente divulgação proporciona um vector para a realização do método da presente invenção, que compreende uma proteína de ligação da parede celular fundida com um terminal N de uma proteína de interesse. As concretizações preferidas deste aspecto da presente divulgação incluem meios para a expressão de um epítipo de polipeptídeo marcado nas células de levedura. Uma forma de

realização mais preferida, prevê que a proteína de ligação da parede celular é uma subunidade de ligação da proteína aglutinina de levedura, mesmo mais preferencialmente, a proteína aglutinina de levedura é Aga2p.

A presente invenção proporciona um método de seleção de proteínas com propriedades fenotípicas melhoradas relativamente aos da proteína de tipo selvagem, compreendendo os passos de: transformação de células de levedura com um vector que expressa uma proteína a ser testada fundida para uma proteína de parede celular de levedura, em que a mutagénese é utilizada para gerar uma população variada de mutantes da proteína a ser testada; marcação das células de levedura com um primeiro marcador, em que o marcador se associa com a levedura que expressa a proteína a ser testada e não se associa com a levedura que não expressa a proteína a ser testada; isolar as células de levedura com as quais o primeiro marcador está associado; e analisar e comparar as propriedades da proteína mutante expressa pela levedura com as propriedades da proteína de tipo selvagem, em que são seleccionadas as células de levedura que exibem proteínas mutantes com propriedades melhoradas sobre a proteína do tipo selvagem. Como descrito acima, um segundo e/ou terceiro marcador pode ser empregue com esta forma de realização, e a seleção de proteínas mutantes de interesse com propriedades fenotípicas melhoradas podem envolver ciclos iterativos dos passos de enriquecimento e de marcação.

Em concretizações preferidas, a proteína de parede celular de levedura é uma aglutinina; a proteína a ser testada é fundida pelo seu terminal N para o terminal C de uma subunidade de ligação de uma aglutinina; a estirpe de

levedura é de um género seleccionado a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, e *Candida*; a proteína a ser testado é um anticorpo, fragmento de anticorpo Fab, Fv ou scFv, mais preferencialmente a proteína a ser testada é o domínio de ligação ao ligando de um receptor da superfície celular, mesmo mais preferencialmente, o receptor de superfície celular é um receptor de células T.

Um objecto da presente invenção é proporcionar um método de escolha para as proteínas mutantes que exibem propriedades fenotípicas melhoradas seleccionados a partir do grupo consistindo em superfície de expressão, estabilidade, nível de secreção, e solubilidade, em que os mutantes da proteína a ser testada podem conter uma única mutações ou várias mutações.

Em ainda um outro aspecto da presente invenção, um segundo marcador pode ser usado para determinar quantitativamente os níveis de expressão de superfície celular, que podem ser utilizados como um ensaio para seleccionar outras características fenotípicas desejáveis, tais como a expressão intracelular, estabilidade, constante de ligação, constante de dissociação, nível de secreção e solubilidade.

As proteínas mutantes seleccionadas pelos métodos da presente invenção podem ser ainda caracterizadas por clonagem do gene que codifica as proteínas mutantes seleccionadas para um vector adaptado para a expressão numa célula eucariótica; e que expressam a proteína mutante na célula eucariótica, em que as propriedades melhoradas da

proteína mutante são confirmadas por comparação das propriedades fenotípicas das propriedades melhoradas da proteína mutante com as propriedades da proteína de tipo selvagem. De preferência, a célula eucariótica é selecionada do grupo que consiste em mamíferos, insectos, ou levedura. Uma vez que o fenótipo do mutante selecionado é uma propriedade intrínseca da "nova" (isto é, mutante) proteína, esta abordagem é também aplicável para a expressão do mutante em outros sistemas de expressão não eucarióticos.

Outro aspecto preferido da presente invenção fornece um método para a exibição de proteínas que não são exibidas como a sua sequência normal ("tipo selvagem"). No exemplo mostrado, o receptor da célula T para o antigénio não foi expresso como a sua sequência de "tipo selvagem". No entanto, após a mutagénese aleatória e seleção por citometria de fluxo com anticorpos específicos da conformação apropriada, os receptores mutantes foram expressos na superfície da célula de levedura. Esta estratégia permitirá a descoberta de novos receptores de células T e proporciona um método para a visualização de virtualmente qualquer polipeptídeo. Assim, a presente invenção também fornece um método para a seleção de proteínas para exibição na superfície de uma célula de levedura, compreendendo a etapa de: transformação de células de levedura com um vector que expressa uma proteína de fusão a ser testada para uma proteína de parede celular de levedura, em que a mutagénese é utilizada para gerar uma população variada de mutantes da proteína a ser testada; marcação das células de levedura com um primeiro marcador, em que o primeiro marcador se associa com levedura expressando a proteína a ser testada e não se associa com a

levedura que não expressa a proteína a ser testada; isolar as células de levedura com as quais o primeiro marcador esta associado; quantificação do primeiro marcador, em que uma maior ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testado tem propriedades desejáveis de visualização, e em que uma baixa ocorrência do primeiro marcador indica que a proteína a ser testado não tem propriedades de exibição desejáveis. De preferência, a proteína testada é um anticorpo, um fragmento de anticorpo Fab, Fv, ou scFv ou o domínio de ligação ao ligando de um receptor da superfície celular. Um exemplo representativo de um receptor da superfície celular é um receptor de células T.

Os exemplos seguintes são apresentados com a finalidade de ilustrar várias concretizações da invenção e não se destinam a limitar a presente invenção em qualquer forma.

EXEMPLO 1

Meio/Tampões

Os seguintes meios/tampões foram aqui utilizados:

E. coli

Meio LB (1x): Bacto triptona (Disco, Detroit, MI): 10,0 g; extrato de levedura Bacto (Difco): 5,0 g; NaCl: 10,0 g. Completar até 1 L, autoclave. Para as placas, adicionar 15 g/L de ágar e autoclave.

Caldo de Ampicilina : 25 mg/ml de sal de sódio de ampicilina em água. Filtrar, esterilizar e armazenar em alíquotas de 4 ml a -20°C. Trabalhando [] = 35-50 mg/ml, 4 ml de alíquota de 1 L → 100 mg/ml, 2 ml de alíquota de 1 L

→ 50 mg/ml. Adicionar ao LB autoclavado só depois de ter arrefecido para ~ 55°C.

Meio SOC (100 ml) : 2% de Bacto triptona: 2,0 g; Extracto de levedura 0,5% (Disco): 0,5 g; 10 mM de NaCl: 0,2 ml de 5 M; 10 mM de MgCl₂: 1,0 ml de 1 M; 10 mM de MgSO₄: 1,0 ml de 1M; 20 mM de Dextrose: 0,36 g. Autoclave ou filtro de esterilização.

Levedura

Sintéticos mínimos + ácidos Casimiro (SD-CAA) 500 mL

Dextrose (glucose)	10,00 g
Base de levedura de azoto e/ou aminoácidos (Difco)	3,35 g
Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O	5,1 g
Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O	4,28 g
Ácidos Casimino (Trp-, Ura-) (Difco)	2,5 g

Adicionar dH₂O para um volume final. Filtrar, esterilizar e refrigerar. Para as placas, dissolver fosfatos de sódio e de sorbitol a 1 M de concentração final em 400 ml de dH₂O. Adicionar 7,5 g de agar e autoclave. Dissolver a dextrose, N₂ de base, e os aminoácidos em 100 ml de dH₂O e filtrar e esterilizar. Adicionar os reagentes filtrados após os sais autoclavados terem arrefecido o suficiente ao toque.

SG-CAA (meio de indução (SD-CAA)	500 mL
Galactose	10,00 g
Base de levedura de azoto e/ou aminoácidos (Difco)	3,35 g
Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O	5,1 g
Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O	4,28 g
Ácidos Casimino (Trp-, Ura-) (Difco)	2,5 g

Adicionar dH₂O para um volume final. Esterilizar por filtração e refrigerar. Rico (YPD) (1000 ml): Extracto de levedura: 10 g; Peptona (Difco): 20 g; dextrose: 20 g. Adicionar dH₂O para 1 L. Autoclave. TAE (Tris-acetato): Solução de trabalho: 0,04 M de Tris-acetato e 0,001 M de EDTA

Caldo (50X):	Em 1L
Base Tris	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
0,5 M de EDTA (pH 8,0)	100 ml

TBE (Tris-Borato): Solução de trabalho: 0,09 M de Tris-borato e 0,001 M de EDTA

Caldo (5X):	Em 1L
Base Tris	54g
Ácido bórico	27,5 ml
0,5 M de EDTA (pH 8,0)	20 ml

Para tampão 10X (Restrição): 50% v/v de glicerol, 0,1 M de EDTA (pH 7,5); 1% p/v de SDS; 0,1% p/v de azul de bromofenol. Combinar todos os componentes, excepto para o corante e o pH a 7,5 antes da adição do corante.

Coloração - brometo de etídio: 0,5 mg/mL em água; Caldo: 10 mg/ml. Diluições do caldo: 1/10 em TBE. Adicionar 100 ml de diluição em 100 ml de tampão.

Solução de trabalho TBS: 10 mM de Tris-HCl, 140 mM de NaCl e 5 mM de EDTA. Filtrar e esterilizar.

EXEMPLO 2

Protocolo: réplica de placas

1. Escolha um material adequado para o levantamento de colónias, tendo a certeza que ele é lavado, seco e estéril.
2. Marque a parte inferior de cada placa de réplica fresca com uma seta para alinhar a placa. Marque também a placa de partida.
3. Pegue a parte superior da placa de partida, vire-a de cabeça para baixo e alinhe a seta na parte inferior com a marca do material de levantamento de colónias. Coloque a placa para baixo sobre a superfície do material e pressione suavemente em toda a placa. Verifique se a placa

não se move em torno depois de ter tocado o material. Remova a placa e substitua a tampa. Podem ser vistas porções das colónias transferidas para o material.

4. Repetir este procedimento com uma das placas de réplica fresca. Certifique-se que as linhas de seta estão para cima com a marca para fazer, também, uma réplica exata. Segure-as contra a luz para ver as pequenas colónias transferidas.

5. Repetir todo o procedimento para cada uma das placas de réplica a ser feita.

6. Incube as placas de réplica em condições adequadas para o crescimento seletivo. As colónias geralmente crescem dentro de um ou dois dias.

EXEMPLO 3

Protocolo: eletrotransformação de levedura

Preparação Celular:

1. Inocular 50 ml de YPD com uma cultura durante a noite para uma DO de 0,1.

2. Cultivar as células a 30°C com agitação vigorosa para uma DO₆₀₀ de 1,3 a 1,5 (cerca de 6 horas).

3. Colher em rotor frio a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Elimine o sobrenadante.

4. Lave as células por ressuspensão em 50 ml de água estéril fria. Centrifugue como acima e descarte o sobrenadante.

5. Repita o passo 4, com 25 ml de água fria.

6. Ressuspenda em 2 ml de 1 M de sorbitol gelado estéril. Centrifugue como acima e descarte o sobrenadante.

7. Ressuspenda em 50 ml de 1 M de sorbitol gelado. O volume final de células é de cerca de 150 ml (o suficiente para três transformações).

Eletrotransformação:

1. Coloque cuvetes de 0,2 cm e câmaras de deslizamento brancas em gelo.

2. Num tubo de eppendorf, adicione 50 ml de suspensão de levedura e misture suavemente em <5 ml (0,1 mg) de ADN de plasmídeo em TE. Certifique-se que adiciona ADN à levedura já em eppendorf. Coloque no gelo por 5 minutos (Este prazo é muito crítico).

3. Defina GENE PULSER a 1,5 kV e 25 mF. Defina o controlador de impulsos para 200 W. A constante de tempo para este impulso deve ser 4,5 a 5,0 ms.

4. Transfira 40 ml da mistura de célula/ADN para a cuvette de electroporação pré-refrigerada. Pressione o conteúdo para baixo, certificando-se que a amostra está em contato com ambos os lados de alumínio da cuvette. Coloque a cuvette em câmaras de deslizamento de segurança refrigeradas. Deslize a câmara até a cuvette fazer contacto com os elétrodos na base da câmara.

5. Aplicar um impulso nas configurações acima.

6. Retirar a corrediça com a cuvette, e imediatamente adicionar 1 ml de 1 M de sorbitol gelado à cuvette. Misture e retorne a cuvette para gelo. Espalhar 200 ml em placas

seletivas contendo 1 M de sorbitol.

EXEMPLO 4

Protocolo: Transformação de *E. Coli*

1. Descongelar alíquota de eficiência de subclonagem competente HB101 (armazenamento a -70°C) sobre gelo, mantendo-se todos os reagentes em gelo. Use células DH5ct para complementação lac z; DM-1 para não-metilação.
2. Dispensar 50 ml de HB101 para os tubos eppendorf necessários, um para cada uma das amostras de ADN, um para o pBR322 (controlo positivo) (pUC19 para DH5a e DM-1), um para nenhum ADN (controlo negativo).
3. Alíquota de células não utilizadas em porções de 50 mL e volte a congelar num banho de gelo seco/EtOH; armazenar a -70°C .
4. Adicionar 1 ml de ADN (1 mg) para os eppendorfs (1 ml de pBR322 ou pUC19), pressione os tubos para misturar, depois incubar em gelo durante 30 min. Para as ligações, usar 1-2 ml de mistura de ligação (demasiado azeda a transformação).
5. Choque térmico a 37°C durante 20 segundos. (45 segundos a 42°C para as células DM-1).
6. Coloque no gelo por 2 minutos, em seguida, adicione 0,95 mL de meio SOC à temperatura ambiente. Incubar a 37°C durante 1 hora em banho (agitação opcional) ou num agitador num quarto a 37°C .
7. Coloque 100-200 ml de células em LB, 100 mg/mL de ampicilina, e incubar durante a noite a 37°C .

EXEMPLO 5

Protocolo: Purificação de ADN GELase®

A preparação Wizard® PCR (Promega; Madison, WI) é um protocolo alternativo para a purificação de ADN a partir de um gel. GELase® é recomendado se o rendimento da preparação Wizard® for baixo. Baixos rendimentos acontecem se os fragmentos desejados têm menos do que 200 kb ou mais de 5 kb de comprimento.

1. Separar os fragmentos de ADN num gel de agarose de baixo ponto de fusão a 1% em tampão 1 x TAE fresco.
2. Corar o gel com brometo de etídio em água. Utilizar a lâmpada UV de mão, cortar os fragmentos de interesse com uma lâmina de barbear nova.
3. Colocar a fatia de gel num tubo eppendorf pré-pesado. Peser ambos novamente para determinar o peso da fatia de gel. Se o peso fatia de gel for mais do que 300 mg, divida amostras nos tubos em duas após o passo 6.
4. Adicionar 2 ml de 50x de tampão GELase® por 100 mg de fatia de gel.
5. Incubar o tubo contendo a fatia de gel a 70°C até que o gel seja completamente fundido. Isso vai demorar pelo menos 20 minutos. Uma boa técnica é esperar 30 minutos, pipetar a mistura para cima e para baixo um par de vezes, e depois esperar mais 10 minutos. Certifique-se de gel fica completamente derretido.
6. Equilibrar o gel fundido a 45°C durante pelo menos 30 minutos.
7. Adicionar 1 U de GELase® por 150 mg de agarose fundida. Incubar durante 4 horas. Para > 600 mg adicionar 2 U de

GELase®.

8. Adicionar 1 volume (volume = 1 mg da fatia de gel) de 5 M de acetato de amônio à solução. Se usar > 300 mg de gel, é necessário um tubo maior para a precipitação com etanol.

9. Adicionar 2 volumes (volume = 1 mg da fatia de gel + acetato de amônio) de 100% de etanol à temperatura ambiente e inverte várias vezes.

10. Sedimentar o ADN por centrifugação durante pelo menos 30 min à temperatura ambiente em 19 de RAL. Se a concentração de ADN é muito baixa, aguardar 30 minutos após a adição de etanol e, em seguida, centrifugue durante 30 minutos.

11. Remover o sobrenadante com uma pipeta e descarte.

12. Lava o sedimento com 70% de etanol à temperatura ambiente.

13. Dissolver o ADN em água ou TE. O ADN pode então ser armazenado a 20°C.

EXEMPLO 6

Protocolo: Ligação

Materiais: ligase de T4 de ADN e tampão de ligase 2x T4
ADN

Para a fosfatase: fosfatase do intestino de vitela (CIP) e tampão (se necessário). Para um fim brusco: mistura de dNTP (0,5 mM). Fragmento Klenow de polimerase I de ADN de *E. coli* ou polimerase de T4 de ADN. Para ligar: oligonucleotídeos ligantes 0,2 mM de TDT.

1. Numa mistura reacional de 20 ml, clivar os componentes

individuais do ADN com a endonuclease de restrição apropriada. Depois da reação estar completa, inativar as enzimas por aquecimento de 15 minutos a 65°C. Se não forem necessários mais tratamentos enzimáticos, prosseguir para o passo 6.

2. Se os fosfatos 5' de um dos ADNs são para serem removidos, adicionar 2 ml de tampão de CIP 10 x 1 U de PIC; incubar 30 a 60 minutos a 37°C. Após a reação estar completa, inativar CIP por aquecimento de 15 minutos a 75°C. Se não forem necessários mais tratamentos enzimáticos, prosseguir para o passo 6.

3. Para o fim brusco, adicionar 1 ml de uma solução contendo todos os 4 dNTP (0,5 mM cada) e uma quantidade apropriada do fragmento de Klenow de polimerase I de ADN de *E. coli* ou polimerase de T4 de ADN; efetuar o enchimento para dentro ou para reação. Depois de completa, inativar as enzimas por aquecimento de 15 minutos a 75°C. Se forem adicionados ligantes de oligonucleotídeos siga para o passo 4. Se um fragmento de ADN contendo apenas um fim brusco for desejado, clivar os produtos de reação com uma endonuclease de restrição adequada. Se não forem necessários mais tratamentos enzimáticos, prosseguir para o passo 6.

4. Adicionar 0,1 a 1,0 mg de um ligante de oligonucleótido adequado, 1 ml de 10 mM de ATP, 1 ml de 0,2 M de DTT, e 20 a 100 de unidades finais coesas de ligase de T4 de ADN; incubar durante a noite a 15°C. Inativar a ligase por aquecimento de 15 minutos a 75°C.

5. Clivar os produtos do passo 4 com a enzima de restrição que reconhece o ligante de oligonucleotídico, ajustando as condições de tampão, se necessário. Se apenas uma das

duas extremidades é para conter um ligante, clivar os produtos com uma enzima de restrição adicional.

6. Isolar os segmentos de ADN desejadas por electroforese em gel, se necessário. Em seguida, purificar (GeneClean II® ou GELase®).

7. Ligação: 9 ml de componentes de ADN (0,1-5 mg), 4 mL de tampão ligase 5x, 1 mL (extremidade coesiva) de ligase de T4 de ADN (BRL: 1 unidade = 300 unidades de extremidades coesivas, quer de 20 a 500 unidades de extremidades coesivas) de água para 20 ml. Incubar 1 a 24 horas a 16°C.

8. Introduzir 1 ml dos produtos ligados em células de *E. coli* competentes e seleccionar os transformantes. Em seguida, faça minipreparações e mapeamento de restrição para o rastreio para o produto desejado.

EXEMPLO 7

Clonagem:

Todas as transformações foram em estirpe DH5a de *E. Coli* seguindo o protocolo do fabricante.

PCR

Ampliwax PCR mediada por gem de PCR inicial quente (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT) - o protocolo do fabricante de tubos de paredes finas.

Reagentes Básicos de GeneAmp PCR (Perkin-Elmer-Cetus)

ADN Thermal Cyclor 480 (Perkin-Elmer-Cetus)

AGA2

Clonado por PCR.

O modelo para PCR foi a biblioteca genómica CEN BANK *S. cerevisiae* (Culture Collection Tipo americano, Rockville, MD).

Iniciadores: 5'-ATTAGAATTCCCTACTTCATACATTTTCAA-3' (SEQ ID N° 10) e

5'-

ATTACTCGAGCTATTACTGCAGagcgtagtctggaacgtcgtatgggtaAAAAACATACT GTGTGTTTATGGG-3' (SEQ ID N° 11).

Perfil térmico:

Desnaturação 1 minuto a 94°C

Recozimento 2 minutos a 41°C (5 primeiros ciclos), 2 minutos a 45°C (25 ciclos adicionais)

Extensão 25 segundos a 72°C

Etapa de polimento final de 10 minutos a 72°C

O produto de PCR foi clonado em plasmídeo pCR-Script utilizando o Kit de clonagem pCR-Script SK (+) (Stratagene, La Jolla, CA) seguindo o protocolo do fabricante. O fragmento AGA2 342 pb foi excisado com *EcoRI* e *XhoI*, purificado em gel de agarose a 1% (protocolo 6.1.7.2) e subclonado em pCR-Script contendo o promotor CUP 1 como um fragmento *KpnI/EcoRI*.

Péptido HA

O peptídeo HA foi inserido por cassete de mutagénesse. Cadeias de oligonucleótidos complementares que codificam a

sequência de reconhecimento do Factor Xa e o epítopo HA foram sintetizados com saliências coesivas, permitindo a ligação à extremidade 3' do sítio *Xho* I do clone AGA2 enquanto ao mesmo tempo a destruição deste sítio; um sítio *Sac*I a jusante em pCR-Script recozido e ligado à construção CUP1-AGA2 na PCR-Script. O inserto inclui um novo sítio *Xho*I na extremidade 3' da sequência de HA. CUP1-AGA2-HA foi excisada como um fragmento *Kpn*I/*Xho*I, purificada em gel de agarose a 1%, e subclonada no vector de vaivém de levedura pRS314 (1) que já contém a sequência de terminação de factor alfa, de modo a formar a superfície de exibição do vector pCT101. Oligo sequências: 5'-TCGACGATTGAAGGTAGATACCCATACGACGTTCCAGACTACGCTCTG CAGTAATAGATTATCCTCGAGCT-3' (SEQ ID N°12) e 5'-CGAGGATAATCTATTACTGCAGAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGGT ATCTACCTTCAATCG-3' (SEQ ID N° 13).

O promotor GAL excisado dos ligantes palindrômicos do vector YCplac22-GAL. 12 pb com saliências coesas apropriadas foi clonado pela primeira vez neste vetor para alterar sítios de restrição em ambas as extremidades: *Eco* RI → *Kpn*I (E/KLINK) e *Bam*HI → *Eco* RI (B/ELINK). O fragmento *Kpn*II/*Eco* RI resultante foi clonado para pCT101 para formar o vetor pCT201. As sequências oligonucleotídicas: E/LLINK 5'-AATTGGTACC-3' (SEQ ID N° 14); B/ELINK 5'-GATCGAATTC-3' (SEQ ID N° 15).

O scFv 4-4-20 foi amplificado por PCR como acima:

Modelo: 4-4-20 em vetor GeneX (obtido a partir de D. Kranz, UIUC Dept. of Biochem.).

Iniciadores: 5'-ggttggccaagctagcGACGTCGTTATGACTCAA-3' (SEQ

ID N°. 16) e

5'-

ggccggccaactcgagctattacaagtccttcagaaataagcttttggtcTGAGGA
GACGGTGA-3' (SEQ ID N°. 17).

Perfil térmico:

Desnaturação 1 minuto a 94°C

Recozimento 2 minutos a 40°C (5 primeiros ciclos), 2
minutos a 48°C (30 ciclos adicionais)

Extensão de 50 segundos a 72°C

Etapa de polimento final de 10 minutos a 72°C

O produto de PCR foi clonado em pCR-Script e subclonado em pCT201 com um fragmento *NheI/XhoI* usando os métodos acima, criando o vector pCT202. O vector pCT302 foi criado através da inserção de um oligonucleótido sintético (UIUC Biotechnology Center) que codifica um ligante (Gli₄-Ser)₃ na estrutura entre o AGA2 e quadros de leitura abertos 4-4-20 de pCT202.

AGA1

Amplificado por PCR como acima:

Modelo: CEN BANK

Iniciadores: 5'-ATTAGAATTCAGCTAAAAAACCAAAAAT-3' (SEQ ID N°18) e 5'-ATTACTCGAGctaTTAACTGAAAATTACATTGC-3' (SEQ ID N° 19).

Perfil térmico:

Desnaturação 1 minuto a 94°C

Recozimento 2 minutos a 41°C (5 primeiros ciclos), 2 minutos a 45°C (25 ciclos adicionais)

Extensão 2 minutos, 20 segundos a 72°C

Etapa de polimento final de 10 minutos a 72°C

O produto da PCR foi purificado em gel utilizando o kit GELase®. O fragmento *KpnI/SstI* de pCT201 foi clonado no vector pRS316. Este foi, em seguida, digerido com *EcoRI* e *XhoI*, o fragmento AGA2 excisado removido por purificação em gel do fragmento do vector restante, e ligado ao produto purificado AGA1 PCR digerido com *EcoRI* e *XhoI*. O clone resultante foi pCT211. O fragmento *KpnII/SstI* de pCT211 foi posteriormente clonado no vetor YIplac211 para formar o vetor pIU211.

EXEMPLO 8

Expressão em leveduras

Estirpe de levedura *S. cerevisiae* BJ5465 (a URA3-52 *trp1* *leu2D1* *his3D200* *pep4*: *His2* *prb1D1.6R* *can* *GAL*). Esta linhagem é uma *pep4* e mutante *prb1*, tornando-se deficientes em proteases. Três marcadores nutricionais foram eliminados e podem ser utilizados para a seleção do plasmídeo: URA3, TRP1, e LEU2. HIS3 foi excluído, mas a exclusão de PEP4 é coberta com um marcador HIS.

Transformação:

O vector pIU211 foi cortado com *BsiWI* que ocorre exclusivamente dentro da sequência AGA1. Aproximadamente

100 ng deste vetor linearizado e 200 ng de pCT202 foram transformados simultaneamente na estirpe de levedura BJ5465 por eletroporação (protocolo 2.6.1). Os transformantes foram selecionados em placas de SD-AAG.

Condições experimentais de indução:

Uma única colônia de levedura transformada com pIU211 e pCT202 foi inoculada em 3 mL de SD-CAA e cultivada ~ 24 horas a 30°C. A densidade celular neste ponto foi ~ 10^7 - 10^8 células/ml (ou seja, OD_{600} ~ 1-3). Foram colhidas células suficientes por centrifugação para inocular 3 mL de SG-CEA para uma OD_{600} de ~ 0,5. Esta cultura foi cultivada ~ 20 horas a 30°C.

EXEMPLO 9

Marcação fluorescente de células de levedura

O método seguinte foi utilizado para a marcação fluorescente das células de levedura:

1. Coletar 0,2 OD-ml (a 600 nm) de células a seguir ao crescimento por 20 horas em SG-CAA por centrifugação para ~ 10-30 segundos a 14000 g.
2. Lavar o sedimento de células por ressuspensão em TBS e girar para baixo.
3. Ressuspender o sedimento em volume apropriado de TBS para fazer um volume final de 100 ml para a incubação. Adicionar as seguintes quantidades de reagentes de marcação, conforme o caso: 1 ml de 25 mg/ml de FITC-dextrano (MW 2000000) (Sigma); 1 mL de Mab 9E10 de ascite fluida (Babco) ou 10 ml de 9E10 a 100 mg/ml (Santa Cruz Biotechnology); 100 ml de 12CA5 Mab (Boehringer-Mannheim) a 10 mg/ml em TBS. Misturar em vórtice ou pipetagem para

cima e para baixo.

4. Incubar 1 hora à temperatura ambiente, misturar as células aproximadamente a cada 20 minutos, alternando o tubo, vórtice, ou pipetagem.

5. Girar as células e resuspender num volume apropriado de TBS para fazer 100 ml de volume final. Adicionar reagentes secundários, conforme o caso, nos seguintes valores: 4 ml α -rato-PE (Sigma); 2 ml α -rato-FITC (Sigma); 1 ml de FITC-dextrano.

6. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.

7. Girar para baixo e lavar como no passo 2.

8. Ressuspender o sedimento em ~ 100 ml de 10 mM de base Tris, pH 8,3 (para nada marcado com FITC) ou TBS por microscopia. Para a citometria de fluxo, ressuspender em 500 ml de 10 mM de Tris (densidade celular final de ~ 10^6 /ml ou mais). As amostras precisam de estar em microtubos de 0,5 ml para citometria de fluxo. Para experiências utilizando biotina-fluoresceína, as células foram cultivadas, induzidas, colhidas, e marcadas tal como descrito com 10 mM de biotina-fluoresceína em vez de FITC-dextrano como a marcação primária, e uma mistura de 3 mg de estreptavidina-PE e 1 mg de F (ab')₂ conjugado RED613 de cabra com anti-rato (Life Technologies, Grand Island, NY), tal como os reagentes de marcação secundários.

EXEMPLO 10

Microscopia de fluorescência confocal

A levedura contendo a expressão de superfície dirigida ao plasmídeo do péptido HA (pCT201) ou a fusão scFv (pCT202)

foi cultivada durante 20 horas em meio contendo 2% de galactose como única fonte de carbono e marcado, subsequentemente, com o mAb 9E10, seguida por um conjugado secundário de IgG-R-ficoeritrina anti-rato (PE) e FITC-dextrano, como descrito. As células marcadas foram montadas em lâminas revestidas de polilisina em glicerol a 90% de meio de montagem contendo 1 mg/mL de p-fenilenodiamina, como um reagente anti-branqueamento e analisadas com um microscópio de varrimento laser confocal (UIUC Beckman Institute Microscopy Suite) a uma taxa de 8 segundos, com uma objectiva de 63x de potência. Foram recolhidas imagens da DIC, fluorescência PE vermelha, e fluorescência FITC verde.

EXEMPLO 11

Análise por citometria de fluxo e triagem.

As suspensões de células de levedura marcadas foram analisadas num citómetro de fluxo Coulter Epics XL no Flow Cytometry Center UIUC Biotechnology Center. A taxa de eventos foi mantida perto de 500 células/seg. A população foi fechada por dispersão de luz para evitar o exame de células agregadas, e foram recolhidos dados para 100000 eventos. Para as experiências de classificação de células inicial, levedura carregando o vetor pCT202 foi misturada com a estirpe original não transformada BJ5465 e classificada com base em sinal FITC num banco células de triagem Coulter 753 modificado com triagem electrónica CICERO (UIUC Flow Cytometry Center). Amostras de pré-triagem e classificadas foram plaqueadas em meio não seletivo, depois as replicadas plaqueadas em meio seletivo para o vector pCT202. A pureza foi determinada como a fracção de colónias não-seletivas, que são viáveis em placas seletivas.

EXEMPLO 12

Quantificação do nível de expressão de anticorpos de superfície.

As células portadoras do vector pCT202 e grânulos Quantum Simply Cellular (Sigma, St. Louis, MO) foram marcadas com conjugado FITC mAb 12CA5 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) a 10 g/mL em TBS, como descrito e analisadas num citómetro de fluxo Coulter Epics XL. A comparação da intensidade de fluorescência da amostra de levedura com os grânulos convencionais permitiu a determinação da capacidade de ligação do anticorpo das células de levedura exibidas por meio de regressão linear utilizando QuickCal para Quantum Simply Cellular (Sigma).

EXEMPLO 13

Análise cinética da dissociação de antigénio a partir de células que exibem scFv.

As células de levedura que ostentam o plasmídeo pCT202 foram cultivadas e marcadas com Mab 9E10 anti-c-myc, e FITC-dextrano ou biotina-fluoresceína, como descrito. Uma fracção da população marcada foi analisada por citometria de fluxo para determinar o nível inicial de fluorescência. Um competidor não fluorescente (5-aminofluoresceína) foi adicionado a uma concentração final de cerca de 10 mM (~1000 vezes em excesso) e a FITC ou fluorescência PE da população de células positivas para c-myc foi seguido como uma função de tempo à temperatura ambiente (21-23°C) num Coulter Epics XL. Os dados foram montados como um decaimento exponencial. A probabilidade de que um antigénio polivalente esteja ligado à célula, como uma função do tempo, é dada por $P = 1 - (1 - e^{-kt})^N$, onde N é a valência, k é a constante de velocidade cinética para a dissociação, e t é o tempo. Por longos períodos de t,

reduz a $P = Ne^{kt}$. Assim, por extrapolação dos dados de t a tempo zero produzem $P = N$, ou uma intensidade de fluorescência $F_{ext} = NF_0$, onde F_{ext} é a fluorescência extrapolada no momento da adição concorrente e F_0 é a fluorescência inicial real. A valência da interação da superfície exibida 4-4-20 scFv e FITC-dextrano polivalente foi, portanto, determinada como a intercepção γ das curvas na Figura 11.

A ligação da fluoresceína solúvel (FDS) foi ensaiada pela observação da supressão de fluorescência por células inteiras exibindo scFv. As células foram suspensas a 2×10^7 células/ml em TBS + 0,1% de BSA numa cuvete de quartzo com termóstato a 23°C e titulada com FDS ao longo de um intervalo de 0-7,5 nM. A fluorescência a 520 nm foi observada com um espectrofluorímetro SLM Aminco SPF-500 usando excitação a 488 nm. As células de controlo que indicam um scFv irrelevante foram tituladas para se obter uma inclinação para um de dois parâmetros de ajuste de um modelo de ligação de equilíbrio para os dados, obtendo-se as constantes de equilíbrio e as concentrações eficazes de scFv. Após a titulação de equilíbrio, foi adicionada 5-aminofluoresceína a 1 mM, e a alteração da fluorescência da amostra seguida com o tempo para determinar k_{off} para FDS.

EXEMPLO 14

Mutagénesse do gene scFv

Aproximadamente 100 ng de pCT302 foram transformados em duplicado em estirpe XL1-Red de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Seguindo uma hora de indução em meio SOC, os dois grupos

de transformantes foram reunidos e 1/2000 do total semeados em meio LB contendo 100 mg/ml de ampicilina para determinar a eficiência de transformação. 5 ml de meio líquido LB contendo 50 mg/ml de ampicilina mais 100 mg/ml de carbenicilina (LB-AMP50-CARB100) foram inoculados com o restante dos transformantes e cultivados durante a noite a 37°C ($OD_{600} \sim 1,0$). Um volume suficiente desta cultura foi recolhido para inocular 50 ml de LB-AMP50-CARB100 a $OD_{600} = 0,01$ num balão de agitação com deflectores e cultivado a $OD_{600} \sim 1,0-1,1$ a 37°C. As células foram recolhidas por centrifugação e utilizadas para inocular 200 ml de LB-AMP50-CARB100 a $OD_{600} = 0,001$, e a cultura foi cultivada a 37°C a $DO_{600} \sim 1,0$. O ADN de plasmídeo foi isolado por meio do kit QIAGEN® Maxiprep (QIAGEN®, Santa Clarita, CA). O ADN recuperado foi retransformado em XL1-Red e o ciclo de crescimento repetido três vezes, obtendo-se um produto final sujeito a cerca de 90 gerações de crescimento na estirpe mutante.

EXEMPLO 15

Expressão da biblioteca e rastreo cinético

50 mg de ADN mutagenizado pCT302 foram transformados em estirpe de levedura EBY100 pelo método de Gietz e Schiestl em dez reações separadas. Os produtos foram reunidos, e 1/2000 do total semeados em meio seletivo para determinar o número total de transformantes. O restante foi inoculado em 50 ml de meio de glicose seletiva, cultivado durante a noite a 30°C, passado a $OD_{600} = 0,1$ e expandido 10 vezes. O meio de galactose seletivo (5 ml) foi inoculado com $OD_{600} = 0,5$ e cultivado durante a noite a 30°C até $OD_{600} = 1,0-2,0$. Amostras de 10^7 células (1 OD_{600} ml) foram marcadas com FITC-dextrano, conforme descrito. Após a marcação, as células foram ressuspensas em 10 mM de 5-aminofluoresceína

e mAb 9E10 à temperatura ambiente durante 20 min, altura em que as amostras de tempo foram lavadas com tampão gelado para parar a dissociação competitiva do FITC-dextrano e marcadas com o anticorpo secundário anti-ratinho-PE como descrito. As amostras foram classificadas num banco Coulter 753 com uma janela de classificação, como mostrado na Fig. 4 e taxa de evento de 4000/sec. 6×10^7 células foram examinadas durante a ronda de classificação 1 e a janela foi ajustada para recolher 0,2% da população. As células recolhidas foram recultivadas em meio de glicose e passaram a galactose, como descrito antes de repetir a competição e classificação. Foram realizadas um total de quatro rondas de classificação e amplificação. 4×10^7 células foram examinadas na ronda 2, e 2×10^7 células em cada uma das rondas 3 e 4. As rondas 1 e 2 foram realizadas no modo de enriquecimento para fornecer uma alta recuperação de todos os clones positivos e as rondas 3 e 4 foram realizadas no modo de purificação para rejeitar células negativas coincidentes e alcançar maiores fatores de enriquecimento. Os produtos da ronda 4 foram semeados para isolar clones individuais.

EXEMPLO 16

Estabelecimento de um sistema de exibição de fusão

Um gene que codifica para uma fusão de um epítopo de péptido marcador com uma proteína de parede celular de levedura foi construído e a expressão de superfície do epítopo verificada. Esta proteína de parede celular, α -aglutinina, está envolvida na adesão célula-célula durante o acoplamento da levedura e, por conseguinte, está exposta na superfície externa da célula como um receptor para as aglutininas em células do tipo de acoplamento oposto. Teste de mistura e experiências de classificação foram

realizados para determinar os rendimentos de purificação numa passagem e em duas passagens e a pureza para triagem de afinidade por citometria de fluxo.

EXEMPLO 17

Aglutininas de acoplamento de levedura

No ciclo de vida da levedura, células haplóides ocorrem como um dos dois tipos de acoplamento possíveis, a ou α . Quando uma célula haplóide e uma célula haplóide α entram em contacto físico, aderem uma à outra por meio de interações específicas, fortes entre proteínas de adesão da superfície celular chamadas "aglutininas". Uma vez ligadas desta forma, as células fundem-se para formar uma célula diplóide. Como uma plataforma para a exibição de anticorpos na parede da célula de levedura, foram construídas fusões de polipeptídeos para uma subunidade de aglutinina- α . Uma vez que o papel fisiológico das aglutininas é exibir locais de ligação da proteína sobre o exterior da célula para interação específica, alta afinidade com outras proteínas, o impedimento estérico artefactual a partir dos componentes da parede celular de levedura foi mínimo.

Como um eucariótico, a levedura possui um aparelho de secreção que é altamente homólogo ao de anticorpos de secretores de linfócitos-B. Como resultado, a secreção artefactual ineficiente dependente do clone deve ser minimizada com este hospedeiro. Numerosos estudos revelaram homologia surpreendente entre a levedura e vias secretoras de mamífero, de tal forma que as moléculas específicas podem ser permutadas sem perda significativa da função, tanto *in vivo* como *in vitro*. A expressão de

rato BIP substitui funcionalmente a levedura bip, cuja expressão é essencial para o crescimento (Normington, 1989). A expressão de mamífero PDI substituirá funcionalmente a levedura PDI, uma outra proteína lumenal de levedura ER essencial (Gunther et al., 1993). Dadas as amplas semelhanças entre a levedura e a secreção de mamíferos, a variabilidade clonal na expressão de anticorpos devido a desdobramento deve ser substancialmente reduzida em leveduras, em comparação com hospedeiros bacterianos. Na verdade, a dobragem, montagem e secreção de anticorpos ativos em levedura tem sido demonstrada anteriormente (Wood et al, '85; Horwitz et al, 88).

Levedura α -aglutinina é sintetizada como duas subunidades: Agalp, que possui uma cauda de fosfatidil-inositol-glicano para a fixação à parede celular e Aga2p, que se liga a α -aglutinina com afinidade elevada ($K_D \approx 1$ nM) (Lipke & Kurjan, 1992). Agalp e Aga2p estão ligadas por intersubunidade de pontes dissulfeto e Aga2p é libertado para o meio de crescimento após incubação com agentes redutores como TDT. Embora caudas de fosfatidilo-inositol-glicano estejam geralmente localizadas numa membrana, a evidência substancial tem acumulado que Agalp está ligada ao glucano fibroso na parede da célula de transglicosilação (de Nobel & Lipke, 1994).

EXEMPLO 18

Construção de Fusão

A fim de estabelecer a viabilidade de utilização de fusões de aglutinina para exibir polipeptídeos na superfície da célula de levedura, um péptido "epítipo marcador" foi

primeiro geneticamente fundido a Aga2p. É simples de alargar esta abordagem a fusões de anticorpos. A passagem das moléculas de scFv, através da via secretora de leveduras é eficiente, uma vez que a dobragem, montagem e secreção de IgG e do Fab ativo tem sido demonstrada em leveduras (Horwitz et al, 1988; Wood et al, 1985).

O gene AGA2 foi clonado por PCR a partir de uma biblioteca genómica de levedura e subclonado num vector de expressão contendo o promotor CUP 1 forte de cobre induzível que permite a variação de 25 vezes do nível de expressão. A sequência de codificação para o epítipo marcador de HA da influenza (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) (SEQ ID N° 1) foi fundida com a extremidade 3' do quadro de leitura aberto AGA2, precedida por um sítio de clivagem de protease específica do sítio do Factor Xa (Ile-Glu-Gly-Arg) (SEQ ID N° 26). A sequência de ADN desta construção é mostrada na Figura 7. Sítios de restrição convenientes foram incluídos para fusão em grelha dos genes de anticorpo de cadeia única.

Embora a fusão Aga2p-HA seja simplesmente um intermediário para a construção da fusão final Aga2p-HA de anticorpo, fornece um meio para a confirmação de que um péptido de fusão é ancorado e acessível na superfície da célula, neste sistema. A ancoragem do péptido HA para a parede celular externa por fusão foi confirmada por coloração de imunofluorescência de células não fixadas integrais com o mAb 12CA5 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), detectada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (Figura 9). Uma vez que as moléculas inteiras do anticorpo 12CA5 se ligam ao epítipo HA, sem

qualquer tratamento bioquímico perturbador da parede da célula, a Aga2p é acessível para o exterior da célula para reconhecimento macromolecular.

Como descrito anteriormente, a subunidade de ligação Aga2p está ligada à parede da célula através de ligações dissulfureto para Agalp, que são covalentemente ancoradas a outros componentes da parede celular. O tratamento com DTT abole a marcação com 12CA5, o que indica que a fusão de Aga2p-HA está ligada à superfície da célula através de ligações dissulfureto. O gene AGA1 foi clonado por PCR e subclonado a jusante do promotor GAL1. A expressão de AGA1 foi induzida pela mudança para meios de crescimento de galactose.

O marcador de epítopo HA foi incluído em fusões de anticorpos, para permitir a marcação de fluorescência dupla para ambos os níveis de anticorpos de superfície e ligação de antígenos marcadas por fluorescência. Esta abordagem separa variações célula-a-célula no nível de expressão de anticorpos a partir de medições de uma única célula de afinidade de antígeno. Por exemplo, a imunofluorescência indireta com IgG secundária marcada com ficoeritrina contra o anticorpo monoclonal a-HA proporciona uma medida do número de anticorpos de superfície, enquanto o antígeno marcado com fluoresceína ligado aos anticorpos fornece uma medida da afinidade de ligação. Porque $\approx 10^4$ cópias de uma aglutinina são exibidas por célula, os efeitos estocásticos sobre medidas de ligação são mínimos. Uma vez que os citómetros de fluxo comerciais podem detectar até 10^3 moléculas de fluoróforo a relação sinal-para-ruído não deverá ser problemática. A

proporção de fluorescência verde (fluoresceína, ou seja, a ligação do antígeno) para a fluorescência vermelha (ficoeritrina, ou seja, o número de anticorpos) é proporcional à fracção de anticorpos ligados pelo antígeno.

A fim de testar os possíveis factores de separação de acordo com este método, as células que expressam o marcador de epítipo HA foram misturadas em proporções definidas com células de tipo selvagem. A mistura de células foi marcada com fluoresceínamarcada a-HA IgG e a subpopulação mais altamente fluorescente foi classificada por citometria de fluxo. A fracção classificada foi recultivada e a fracção de células que possuem a fusão Aga2p-HA foi determinada por plaqueamento de réplicas de um marcador genético associado com o vector de expressão. A partir desta informação, foi estimada a purificação por uma única passagem possível por este método.

EXEMPLO 19

Fusão de uma única cadeia de anticorpo anti-fluoresceína com uma aglutinina

Um anticorpo de cadeia simples anti-fluoresceína com base no anticorpo monoclonal 4-4-20 foi construído e caracterizado (Bird, '88; Davis et al, 1991). Este anticorpo de cadeia única é conhecido por dobrar estavelmente e manter a afinidade comparável aos fragmentos de Fab. O gene para o anticorpo monoclonal 4-4-20 foi fundido com o gene de fusão existente AGA2-HA para a expressão na superfície da célula de levedura.

Os anticorpos monoclonais contra a fluoresceína são um

sistema de modelo útil para o estudo físico-químico da interação anticorpo-hapteno. A cinética da ligação de anticorpo-antigénio (Kranz et al., 1982), a análise termodinâmica de complexação (Herron et al., 1986), o papel das interações electrostáticas (Omelyanenko et al., 1993), e a mutagénese dirigida ao sítio de um sítio de ligação do anticorpo (Denzin et al., 1993) têm sido estudados utilizando este sistema.

A funcionalidade da fusão 4-4-20 exibida foi determinada por ligação multiplicando o dextrano marcado com fluoresceína (Sigma). Uma vez que a ligação ao anticorpo sacia as emissões de fluoresceína, a fluoresceína detectada representa grupos amarrados ao dextrano que são ligados à levedura via a fluoresceína 4-4-20 ligada.

EXEMPLO 20

Desenvolvimento da estrutura de exibição

A levedura possui dois receptores da superfície celular disponíveis conhecidos como a- e α -aglutinina que funcionam para mediar a adesão célula-célula entre células haplóides a e α como um prelúdio para a fusão para formar o diplóide (Lu, 1995). α -aglutinina foi mostrada ser ligada de forma covalente ao glucano da parede celular do terminal C (Lu, 1995; Schreuder, 1993), e a aglutinina a- acredita-se ser ancorada por uma ligação semelhante (Lu, 1995). A fusão para a porção do terminal C de uma aglutinina foi usada anteriormente para ancorar as enzimas e os antigénios virais na superfície de levedura (Schreuder, 1993).

Como um sistema modelo para o desenvolvimento do método de

rastreio de bibliotecas de exibição de superfície de levedura, tem-se exibido um scFv anti-fluoresceína funcional e epítipo marcado c-myc na parede celular de levedura por meio da fusão de aglutinina a, que ao contrário de α -aglutinina é uma glicoproteína de duas subunidades (Fig. 2). O resíduo 725 da subunidade Aga1p vai ancorar o conjunto à parede celular (Roy, 1991), através de ligação covalente de β -glucano (Lu, 1995); a subunidade Aga2p de ligação ao aminoácido 69 está ligada a Aga1p por duas pontes dissulfeto (Cappellaro, 1994). A atividade de ligação α -aglutinina nativa está localizada no terminal C de Aga2p (Cappellaro, 1994); assim, representa um domínio molecular, com a acessibilidade às macromoléculas extracelulares e um sítio útil para prender as proteínas para exibição. Foi calculado um vector para a exibição de proteínas na forma de fusões de terminais C para Aga2p (Figura 3).

EXEMPLO 21

Verificação da expressão e localização da superfície de scFv

A expressão da fusão Aga2p-scFv é dirigida pelo promotor indutível de GAL1 (Johnston, 1984). O crescimento de levedura em meio de glucose permite a repressão essencialmente completa da transcrição a partir do promotor GAL1, uma consideração importante para evitar contrasseleção contra sequências que influenciam negativamente o crescimento do hospedeiro. Alternando as células para o meio contendo galactose induz-se a produção dos produtos dos genes de fusão Aga1p e Aga2p, que se associam na via secretora e são exportados para a superfície da célula. A superfície de localização da fusão Aga2p-scFv foi verificada por meio de microscopia

confocal de fluorescência e citometria de fluxo. As células marcadas simultaneamente com um mAb anti-c-myc e fluoresceína conjugada com dextrano (FITC-dextrano) foram examinadas por microscopia confocal de varrimento a laser (Figura 8). As células de controlo contendo um vector que dirige a exibição de um péptido irrelevante (isto é, apenas, um epítipo marcador de hemaglutinina (HA)) não são marcadas pelo mAb específico para o epítipo c-myc ou FITC-dextrano (Fig. 8A).

Em contraste, as células portadoras do vector de exibição de superfície pCT202 expressando a fusão Aga2p-scFv-c-myc são comarcadas tanto pelo anticorpo anti c-myc como por FITC-dextrano (Figura 8B), o que demonstra que o sítio de ligação do antigénio é acessível às macromoléculas muito grandes. Ambas estas estirpes são coradas positivamente pelo mAb 12CA5 dirigido contra o marcador de epítipo HA. A acessibilidade da fusão para a ligação tanto a IgG intacta (150 kDa) como 2×10^6 Da de polímero de dextrano indica uma falta de impedimento espacial significativo de componentes da parede celular, uma vantagem significativa em relação às proteínas de superfície de exibição de *E. coli* que estão enterradas dentro de uma camada de lipopolissacarídeo que forma uma barreira à difusão de macromoléculas.

A análise por citometria de fluxo bicolor destas estirpes de levedura demonstra igualmente a acessibilidade de scFv exibido na superfície celular. O controlo negativo e estirpes de exibição de scFv foram marcados com o anti-c-myc mAb 9E10 e FITC-dextrano simultaneamente. Os histogramas bivariados demonstram uma relação linear entre

a intensidade de fluorescência de ficoeritrina (nível de ligação mAb 9E10) e fluorescência FITC (ligação ao antígeno) para a população de células portadoras do plasmídeo de exibição 4-4-20, enquanto a população de controlo apresenta a fluorescência de fundo (Figuras 9A e B). A distribuição da intensidade da fluorescência na fracção positiva ilustra a importância de corrigir o sinal de ligação do antígeno para a variabilidade da célula-a-célula no número de fusões indicadas, conforme determinado por marcação com epítipo marcado.

A quantificação da eficiência de exibição por comparação de uma população de células de scFv exibidas com padrões de calibração de capacidades de ligação de anticorpo conhecidos produz um valor médio superior a 3×10^4 fusões por célula. O tratamento das células que exibem a fusão Aga2p-scFv com ditiotretol antes da marcação elimina a coloração da superfície da célula tanto por FITC-dextrano como por mAb 9E10 (Figura 9C), consistente com a adesão da proteína de fusão à superfície da célula por uma interação específica de ligação dissulfureto entre a subunidade recombinante Aga2p e Aga1p. Esta propriedade ilustra uma outra característica importante do sistema de exibição de levedura, ou seja, que as proteínas podem ser simplesmente libertadas da superfície da célula, por redução para posterior caracterização.

Para examinar mais a especificidade da interação 4-4-20/fluoresceína, foi realizado um ensaio de dissociação competitiva usando um análogo não-fluorescente de fluoresceína, 5-aminofluoresceína. A análise destes dados produz uma constante de velocidade de dissociação

monovalente (k_{off}) de 21°C de $3,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para FITC-Dextrano e $3,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para fluoresceína-biotina. A extrapolação do ajuste exponencial para $t = 0$ seg mostra que a valência média da interação de uma molécula de FITC-dextrano com scFv é inferior a 1,5. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando a inulina fluoresceinada, albumina do soro de bovino conjugada com fluoresceína e fluoresceína-biotina como o competidor, indicando que a marcação das células com FITC-dextrano ou fluoresceína-biotina é devido a uma interação específica entre a fusão exibida e a porção de fluoresceína. Além disso, a cinética de dissociação de sal dissódico de fluoresceína (FDS) a partir da superfície exibida 4-4-20 scFv condiziam com os da produção em levedura solúvel 4-4-20 scFv como observada por espectrofluorimetria.

EXEMPLO 22

Enriquecimento de células exibidas por citometria de fluxo de separação de células

Para determinar a eficácia da triagem por citometria de fluxo com a exposição de superfície de levedura, as misturas de levedura tendo o vector de exposição de superfície, com aqueles que não possuem o marcador selecionável associado foram classificados e as purezas determinada de forma independente pela réplica de placas. São obtidos os factores significativos de enriquecimento (até 600 vezes) (Tabela I). Assim, os clones raros podem ser selecionados a partir de bibliotecas de exibição de levedura enriquecendo inicialmente as células positivas em rigor relaxado e de alto rendimento para fornecer uma população menor, que pode então ser submetida a vários passos de triagem mais rigorosa para isolar os clones raros.

TABELA 1

**Células exibindo 4-4-20 podem ser seletivamente
enriquecidas por citometria de fluxo**

Fração Inicial	Réplica	Fração classificada	Enriquecimento
<u>w/pCT202</u>	<u>Colônias</u>	<u>w/pCT202</u>	<u>Factor</u>
14%	48/58	83%	6x
0,5%	87/92	95%	200x
!!-0,1%*	34/58	59%	600x

* a fração inicial foi estimada por citometria de fluxo

EXEMPLO 23

**Isolamento de mutantes scFv com menor k_{off} de uma biblioteca
de exibição de levedura mutagenizada**

Foi descrita a seleção de genes scFv mutados aleatoriamente por propagação numa estirpe "modificadora" de *E. coli* (Low, 1996). Uma biblioteca de $\sim 5 \times 10^5$ 4-4-20 scFv mutantes criada por propagação do vector de exposição de superfície em leveduras no qual a estirpe foi expressa em levedura. O conjunto de células que apresentem a biblioteca de scFv foi submetido a seleção cinética por competição de células marcadas com FITC-dextrano com 5-aminofluoresceína. As células positivas c-myc exibindo a maior proporção de FITC para fluorescência PE foram recolhidas por classificação através de citometria de fluxo de (Figura 10A), amplificado por re-crescimento em condições de fusão reprimida (fonte de carbono glicose), induzidos por exposição a fusão de superfície, e re-classificadas. As células que demonstraram um substancial aumento do tempo de persistência da marcação de FITC-dextrano foram enriquecidas dramaticamente após três ciclos de triagem e amplificação (Figura 10).

A cinética de dissociação de FITC-dextrano para dois clones individuais selecionados a partir da biblioteca de scFv diferia em 2,9 vezes em comparação com o 4-4-20 scFv de tipo selvagem (Figura 11). As constantes de velocidade para os mutantes eram de $1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (mutante 4M1.1) e $2,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (4M1.2) a 23°C , em comparação com $5,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para de tipo selvagem; experiências similares produziram valores de k_{off} de fluoresceína-biotina de $2,4 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$, $2,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, e $5,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Além disso, a cinética de dissociação da fluoresceína solúvel determinada por espectrofluorometria demonstrou uma melhoria de 2,2 vezes para ambos os mutantes em relação ao tipo selvagem, e as experiências iniciais de equilíbrio da fluorescência sugerem melhorias semelhantes na constante de afinidade da reação de ligação. O isolamento de clones com apenas a redução de três vezes sem taxa demonstra a capacidade deste método de rastreo para alcançar distinções quantitativas precisas.

Dos 26 clones selecionados analisados individualmente, dois melhoraram identicamente em k_{off} (4M1.1 e 4M1.2, descrito acima); dois demonstraram k_{off} de tipo selvagem com uma diminuição na marcação c-myc distorcendo o nível de expressão linear/relação de atividade; um exibiu um k_{off} de tipo selvagem e marcação de c-myc; e 21 ligados com um k_{off} aparente aproximadamente 10 vezes menor do que o de tipo selvagem só para 2×10^6 Da de FITC-dextrano polivalente, mas não para FITC-dextrano monovalente ou fluoresceína-biotina. O enriquecimento de clones com maior avidéz resultou do uso de antígeno polivalente (aproximadamente 90 fluoresceínas por dextrano); os efeitos de avidéz podem ser efetivamente evitados por concepção adequada das condições de triagem para garantir a ligação do antígeno monovalente.

Além disso, a seleção de mutantes de epítipo marcados pode ser eliminada por operações alternadas de detecção de nível de expressão de c-myc e HA marcados em rondas sequenciais de classificação, ou através de estratégias alternativas de mutagenese dirigidas, apenas, a alterações ao gene scFv.

Estes resultados mostram que os fragmentos scFv podem ser apresentados na superfície da levedura de um modo acessível para reconhecimento macromolecular e propícios para a construção da biblioteca combinatória e rastreio. O scFv exibido liga-se especificamente ao antígeno - a primeira demonstração de um fragmento de anticorpo funcional apresentado na superfície da célula de levedura. A aplicação deste sistema de exibição para os métodos de biblioteca para a maturação da afinidade *in vitro* de anticorpos e para a exibição de outras proteínas de mamífero é uma alternativa complementar importante para tecnologias existentes, tais como a exibição de fagos, exibição de superfície bacteriana, e o método de levedura de dois híbridos. De facto, o sucesso literal da primeira tentativa do sistema de exibição de levedura em recuperação de mutantes de scFv de ligação à fluoresceína melhorada de uma relativamente pequena biblioteca em condições de triagem não-otimizadas demonstra claramente a robustez desta tecnologia. A análise cinética altamente quantitativa demonstrada da superfície amarrada de scFv e discriminação fina de clones com características de ligação semelhantes atesta ainda mais o grande potencial de exibição de levedura para a otimização combinatória das proteínas.

EXEMPLO 24

Exibição de um anticorpo para o receptor de células T no sistema de exibição de levedura

Nisto, um scFv (KJ16) específico para a região VB8 do receptor de células T (Roehm et al., 1985) foi expresso no sistema de exibição de levedura. Este scFv-KJ16 inibiu a atividade de células T por bloqueio competitivo do reconhecimento de um ligando de TCR, tais como o superantígeno enterotoxina B de estafilococos (Cho et al., 1995). Uma vez que as variantes de afinidade deste scFv podem mostrar inibição de células T melhorada, foi examinada a utilização do sistema de exibição de levedura em formas manipuladas de maior afinidade de scFv-KJ16.

Foi desenvolvida uma exibição de acordo com o equilíbrio da ligação de superfície celular de scFv de antígeno marcado por fluorescência, uma TCR de cadeia única de VB8 (Schlueter et al., 1996). Usando dois canais de fluxo de triagem, seleção baseou-se, também, na ligação de um anticorpo anti-c-myc marcado com fluorescência com um c-myc marcado de dez resíduos no terminal carboxilo do scFv. Foi isolada a variante de scFv com uma maior afinidade para o TCR ou com uma menor afinidade para o anticorpo anti-c-myc. Como esperado, os primeiros têm uma mutação num CDR (V_L CDR1) e o segundo tinha uma mutação no epítipo c-myc. Assim, estes resultados demonstram que a abordagem de exibição de levedura pode ser utilizada para isolar scFv de maior afinidade ou para identificar os epítopos de uma proteína exibida reconhecida por um determinado Mab.

Plasmídeos e Estirpes

Os genes V_L e V_H de scFv-KJ16 unidos por um ligante 205 modificado (Cho et al., 1995) foram subclonados por PCR no

vector pCR-Script (Stratagene, La Jolla, CA) seguindo o protocolo do fabricante. Um marcador de epítopo c-myc foi incluído no terminal carboxi do scFv. O fragmento de ~ 800-bp *NheI/XhoI* contendo o scFv foi excisado a partir de pCR-Script e ligado no vector de exibição de superfície de levedura pCT202 contendo um marcador de epítopo de nove resíduos (HA) e o quadro de leitura aberta AGA2 a jusante do promotor induzível GAL1. A construção resultante foi transformada pelo método de transformação de acetato de lítio (LiAc) de Gietz e Schiestl (Gietz et al., 1995) na estirpe de *S. cerevisiae* BJ5465 (um *ura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4:His2 prbD1.6 can1 GAL*; Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA) que contém um AGA1 cromossomicamente integrado controlado pelo promotor GAL1 (estirpe EBY100).

EXEMPLO 25

Indução e detecção de scFv-KJ16 na superfície da levedura

As células de levedura transformadas com pCT202/scFv-KJ16 foram cultivadas durante a noite a 30°C com agitação em 3 ml de meio de glicose seletiva SD-CAA (2% em peso de glucose, 0,67% em peso de base azotada de levedura Difco, 0,5% em peso de casaminoácidos). Após cerca de 18-20 horas, a expressão recombinante de AGA1 + AGA2-scFv foi induzida a 20°C, com agitação em 5 ml de meio de galactose seletiva (SG-CAA, em que 2% de galactose substitui a glucose em SD-CAA). As culturas foram colhidas depois de ~ 20-24 horas (1-2 duplicações) por centrifugação, lavadas com PBS (10 mM de NaPO₄, 150 mM de NaCl, pH 7,3) contendo 0,1% de albumina de soro bovino e 0,05% de azida, e incubadas 45 minutos em gelo com 25 mL de 10 mg/ml de Mab anti-HA 12CA5 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), anti-c-myc 9E10 Mab (diluição a 1:100 de fluido de ascite em bruto; Berkeley Antibody Co., Richmond, CA), ou scTCR biotinilado [~ 360 nM], preparado a partir de corpos de

inclusão, expressos em *E. coli* (Schodin et al., 1996). As células foram lavadas com PBS e incubadas 30 minutos em gelo, com FITC marcado com $F(ab')_2$ de IgG de anti-ratinho de cabra (1:50; Kirkegaard and Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD) ou um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (1:100; PharMingen, San Diego, CA). As células de levedura marcadas foram analisadas num citómetro de fluxo Coulter Epics XL no Flow Cytometry Center do UIUC Biotechnology Center. A taxa de eventos foi de ~ 250 células/seg. Os dados de 10000 eventos foram recolhidos, e a população foi fechada de acordo com a dispersão de luz (tamanho) para evitar a análise de aglomerados de células. Estas condições também foram utilizadas para gerar isotérmicas de ligação ao antigénio de equilíbrio após incubação de levedura scFv-KJ16 com várias diluições de scTCR. A análise Scatchard foi realizada para determinar os valores de K_D , usando a concentração estimada de scTCR biotinilado e as unidades de fluorescência tiradas diretamente dos dados de fluxo.

EXEMPLO 26

Produção de uma biblioteca de mutantes scFv-KJ16 aleatórios

Aproximadamente 50 ng de pCT202/scFv-KJ16 foram transformadas em células de *E. coli* XL1-Red (Stratagene, La Jolla, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a indução de um 1 hora em meio SOC, a recuperação foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos e ressuspensa em 500 ml de meio líquido LB contendo 100 mg/ml de ampicilina, mais 50 mg/ml de carbenicilina (LB-AMP100-CARB50). A ressuspensão foi adicionada a 15 ml de LB-AMP100-CARB50 num frasco Erlenmeyer de 50 ml e cultivada a 37°C com agitação. A cultura foi reabastecida com 15 ml de LB-AMP100-CARB50 fresco em fase mid-log ($OD_{600} \sim 0,2-0,4$), e depois cultivada para saturação ($OD_{600} \sim 1,0-1,1$, o que foi considerado um

"ciclo" ou ronda de mutação). Uma pequena fracção da cultura (0,75 ml) foi adicionada ao ciclo seguinte (15 ml de LB-AMP100-CARB50). Depois de seis ciclos de crescimento, as preparações de plasmídeo de ADN Wizard Miniprep (Promega, Madison, WI), foram realizadas em cultura de 15 ml. Aproximadamente 4,5 mg de ADN pCT202/scFv-KJ16 a partir do ciclo seis foram transformados em cada um dos três tubos de estirpe de levedura EBY100 utilizando o método de LiAc (Gietz et al., 1995). As três reações foram reunidas e após ressuspensão em 1 ml de ddH₂O, 1/2000 do total foi semeado em placas seletivas para determinar a eficiência da transformação. Cinquenta mililitros de SD-CAA foram inoculados com o restante da cultura, cultivados durante a noite a 30°C com agitação, passados a OD₆₀₀ = 0,05, e cultivados durante a noite a 30°C a OD₆₀₀ > 1,0. Cinco mililitros de SG-CAA foram então inoculados com OD₆₀₀ ~ 0,5 e cultivados durante a noite a 30°C com agitação a OD₆₀₀ = 1,0-2,0.

EXEMPLO 27

Seleção de biblioteca mutante scFv-KJ16 por FACS

As células foram duplamente marcadas tal como descrito acima, com anti-c-myc Mab e scTCR biotinilado (utilizado a uma concentração de ~ 10 nM). O volume de reação foi ajustado para manter o excesso molar de ~ 10 vezes de antígeno (scTCR) sobre superfície de scFv. As amostras foram classificadas num banco Coulter 753 com uma janela de classificação conforme mostrado na Figura 3 e uma taxa de eventos de 4000 células/seg. Um total de 8×10^7 células foi examinado durante a primeira ronda de triagem, com 0,1-0,4% da população recolhida. As células recolhidas foram re-cultivadas a 30°C em SD-CAA e mudadas para SG-CAA antes da próxima ronda de classificação. Um total de 4 rondas de classificação foi realizado, com as duas primeiras em modo

de enriquecimento (alta recuperação de todos os clones positivos) e as últimas duas em modo de purificação (células negativas coincidentes rejeitadas). Imediatamente após a última classificação, as células recolhidas foram re-classificadas e colocadas em placas seletivas para isolar os clones individuais.

EXEMPLO 28

Resgate e sequenciamento de genes scFv-KJ16 mutantes

Os plasmídeos de levedura scFv-KJ16 (peso e dois mutantes) foram resgatados de acordo com o protocolo descrito por Ward (Ward, 1991), excepto que as células foram rebentadas com um batedor de talão (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) durante 2 minutos em vez de centrifugação. As células foram centrifugadas durante 1 minuto, sendo a fase superior (aquosa) recolhida. Foi utilizado um kit de minipreparação Wizard® (Promega, Madison, WI) para preparar o ADN de plasmídeo e as células competentes de *E. Coli* DH5a (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) foram transformadas com 1 ml da preparação de ADN utilizando o método de CaCl₂. As transformações foram plaqueadas em LB-AMP50. O sequenciamento de peso de scFv-KJ16 e dois mutantes (Mut4 e mut7) foi realizado utilizando iniciadores que ladeiam o scFv do vetor de exibição e sequenciamento de fluorescência automatizada (Genetic Engineering Facility do UIUC Biotechnology Center).

EXEMPLO 29

Ligação TCR pela superfície celular da levedura scFv

O anticorpo KJ16monoclonal anti-TCR reconhece um epítipo conformacional na cadeia VB8 do TCR (Brodnicki et al., 1996). KJ16 tem sido utilizado por muitos estudos *in vivo* em ratos, incluindo esforços para atingir e eliminar a

população VB8 de células T (Born et al., 1987, McDuffie et al., 1986, Roehm et al., 1985). Para avaliar os possíveis efeitos da variação de afinidade de anticorpos em mediar estes efeitos, foi examinada a utilização de um sistema de exibição de levedura para identificar variantes KJ16 com uma maior afinidade para TCR. O gene scFv do anticorpo KJ16 anti-TCR foi clonado anteriormente e a proteína scFv exibiu aproximadamente a mesma afinidade, $K_D \sim 120$ nM, como os fragmentos Fab KJ16 (Cho et al., 1995).

A sequência de codificação scFv-KJ16 foi subclonada de forma a ser expressa como um polipeptídeo de fusão com a subunidade de aglutinina Aga2p expressa na superfície da célula de levedura. O polipeptídeo de fusão inclui um epítipo marcador de hemaglutinina (HA) do terminal N de para o scFv e um marcador de epítipo c-myc no terminal carboxilo. A inclusão desses epítipos permite anticorpos monoclonais anti-HA (12CA5) e anti-c-myc (9E10) para serem utilizados em citometria de fluxo para quantificar a expressão de superfície scFv de comprimento completo, independentemente da atividade de ligação ao antigénio. Tal normalização ajuda a ter em conta os efeitos de variabilidade de célula-a-célula em níveis superficiais do polipeptídeo de fusão. Como discutido abaixo, a disponibilidade de dois marcadores de epítipo independentes pode também controlar a seleção de mutantes de epítipos individuais que não podem ser desejados na pesquisa de mutantes de ligação ao ligando. Para avaliar as propriedades de ligação da superfície celular de scFv, foi biotinilado um polímero solúvel de cadeia simples VB8-VA3 TCR (Schodin et al., 1996) e o ligando ligado foi detectado com um conjugado de ficoeritrina-estreptavidina.

A Figura 12 mostra que a levedura transformada com o plasmídeo scFv-KJ16/Aga2 expressa o epítipo HA (Figura 12A) e o epítipo c-myc (Figura 12B). A levedura de controlo transfectada apenas com o vector de expressão Aga2p/HA foi positiva para o anticorpo anti-HA Mab mas não para o anticorpo anti-c-myc. A fracção de células na população não-fluorescente foi encontrado depender da estabilidade do plasmídeo e a fase de crescimento da cultura, mas os processos fisiológicos envolvidos são desconhecidos. No entanto, diminuindo a temperatura de indução para 20°C e diminuindo o tempo de indução para menos de duas duplicações de cultura produz populações com > 75% das células que exibem o scFv-KJ16. scFv-4-4-20 foi apresentado com este sistema com aproximadamente a mesma percentagem de células positivas.

A ligação do scTCR biotinilado à superfície celular de scFv também foi detectada por citometria de fluxo (Figura 12C). A fracção de células que expressavam scFv ativo foi semelhante ao detectado com anticorpos anti-HA e c-myc, consistente com a expressão scFv de comprimento completo, devidamente dobrada. Além disso, os histogramas de duas cores demonstraram uma estreita correlação da ligação scTCR tanto com a exibição do epítipo HA como c-myc. A ligação scTCR biotinilado é específica para leveduras exibindo scFv-KJ16, e foi completamente inibida por um excesso de KJ16 IgG solúvel (Figura 12D).

A afinidade aproximada da superfície exibida de scFv-KJ16 foi determinada *in situ*, na parede da célula por titulação de células inteiras com diferentes concentrações de scTCR biotinilado. A ligação de equilíbrio foi medida por análise de ligado de células scTCR por citometria de fluxo.

A análise de Scatchard dos dados de ligação (Figura 13) produziu uma K_D de 500 nM, dentro de cinco vezes do que a observada para scFv-KJ16 solúvel. Tal acordo é razoável, uma vez que K_D foi calculado com base no pressuposto de que 100% do scTCR estava ativo, susceptível de ser uma superestimativa (ou seja, se apenas 20% foram corretamente dobrados, então a superfície de scFv teria um $K_D \sim 100$ nM). Anteriormente, foi encontrada uma fração substancial de scTCR purificado a partir de corpos de inclusão de *E. coli* solubilizado incorretamente dobrada (Schodin et al., 1996).

EXEMPLO 30

Seleção de scFv-KJ16/levedura mutagenizado por classificação de células ativadas por fluorescência

Uma estirpe mutante de *E. coli* foi utilizada para mutagenizar um scFv para a maturação de afinidade por exibição em fagos (Low et al., 1996). Esta abordagem foi bem-sucedida na identificação de um mutante de scFv-4-4-20 com uma afinidade mais elevada para a fluoresceína, utilizando exibição de levedura. Uma vantagem desta abordagem de mutagénese é a sua simplicidade, necessitando apenas de transformação de *E. coli* e crescimento celular. Além disso, a estirpe mutante de *E. coli*. introduz mutações ao longo do plasmídeo de expressão, e, portanto, não muda para porções de scFv que se acredita serem importantes para determinar as características de ligação. Se este aspecto da mutagénese da estirpe mutante é vantajoso depende da capacidade para identificar resíduos chave, que podem influenciar a ligação ao antígeno, com base na informação estrutural disponível. O exame de estudos de maturação de afinidade publicados sugere que a localização destes resíduos, em geral, os resíduos de não-contato, não é ainda previsível, a priori (Hawkins et al., 1993, Patten et

al., 1996, Schier et al., 1996, Thompson et al., 1996, Yang et al., 1995, Yelton et al., 1995).

Para aplicar esta estratégia para scFv-KJ16, o plasmídeo scFv-KJ16/Aga2 foi propagado na estirpe mutante de *E. Coli* XL1-Red (Stratagene) por seis ciclos de crescimento. Este procedimento foi previsto para introduzir uma média de duas a três mutações pontuais na sequência de codificação de scFv, com base numa taxa de mutação por ciclo de 1 em 2000 bps. A preparação de plasmídeo resultante foi transformada em levedura originando um tamanho de biblioteca de aproximadamente 3×10^5 transformantes. Em outro trabalho, bibliotecas maiores (10^7) foram obtidas por otimização de procedimentos de transformação e pela reunião de transformações independentes. Este número não representa um limite de tamanho máximo para a construção da biblioteca, onde outros esforços de otimização e aumento da escala poderiam ser diretamente aplicados.

A biblioteca de levedura mutagenizada foi submetida a quatro ciclos sucessivos de triagem e amplificação, utilizando uma mancha dupla para o anticorpo anti-c-myc de ligação (FITC) e de ligação de scTCR biotinilado (PE). TCR biotinilado foi utilizado numa diluição de 1:5000 (~ 10 nM) que originou um pouco abaixo do limite detectável de ligação em peso de scFv-KJ16/levedura (Figura 13). Os dois perfis de canal de fluorescência da amostra de scFv-KJ16 mutado após um ciclo de triagem (Figura 14A) e, depois de quatro ciclos de triagem (Figura 14B) são mostrados. As células que exibiram fluorescência acima da janela diagonal mostrada na Figura 14 foram recolhidas para recrescimento. A justificativa para esta janela diagonal foi que, em qualquer ronda os critérios de classificação foram baseados

em antígeno de ligação por exibição de fusão do polipeptídeo. Por exemplo, a seleção baseada apenas em níveis mais elevados de fluorescência PE (ou seja, a ligação scTCR) incluiria não apenas os mutantes com maior afinidade scFv, mas aqueles que exibem uma maior densidade de scFv por célula de levedura. Os últimos mutantes que, em princípio, seriam eliminados, incluindo o anticorpo anti-c-myc, como um dos dois parâmetros para normalizar para a expressão de superfície de variabilidade. As duas primeiras rondas de triagem foram realizadas no modo de enriquecimento, isolando ~0,5 % da população de células com maior fluorescência e não definindo o tipo de software para rejeitar coincidências (duas células na mesma gota classificada). As duas últimas rondas de classificação foram realizadas para a pureza, com alta rejeição de coincidência. Após o quarto ciclo, as células foram reclassificadas imediatamente e plaqueadas. Dez colônias (mut1 - 10) foram selecionadas para análise posterior.

EXEMPLO 31

Caracterização do mutante scFv-levedura

Cada um dos 10 mutantes selecionados foi marcado com anticorpos anti-HA, anticorpos anti-c-myc, e TCR biotinalado e foi analisado por citometria de fluxo (Figura 15). Como seria de esperar, um clone (mut6) apareceu fenotipicamente semelhante ao peso scFv-KJ16/levedura. Outro clone (mut7) foi encontrado para exibir níveis mais elevados de ligação TCR, um resultado confirmado por várias titulações independentes. Finalmente, uma série de mutantes (mut 1-5, 8, 9) mostraram consistentemente reduzida ligação para o anticorpo anti-c-myc em comparação com a ligação do anticorpo anti-HA ou o scTCR biotinilado. A presença desta classe de mutantes pode ser explicada pela especificação da janela de classificação diagonal: como mostrado na Figura

14, as células podem se "mover" para a janela de classificação quer aumentando a ligação de scTCR (PE) a uma velocidade constante de sinal de c-myc (FITC), ou, alternativamente, através da diminuição da ligação de c-myc (FITC) a um sinal constante scTCR (PE). A seleção destes mutantes pode ser facilmente contornada, utilizando ambos os marcadores de epítipo de fusão, HA e c-myc. Assim, por meio de marcação de cada um destes epítopos marcadores em cada ronda de triagem alternada, diminuiu a ligação a um dos marcadores de epítipo que não seria enriquecido em rondas consecutivas de triagem como no presente caso.

Os histogramas de fluorescência do mutante do epítipo c-myc presumível (Mut4), a ligação do mutante scTCR (mut7) e outro mutante (mut10) foram comparados com o peso de scFv (Figura 16). Mut4 (Figuras 16A e 16B) mostrou uma redução na marcação de anti-c-myc, mut7 mostrou aumento da ligação scTCR (Figuras 16C e 16D), e mut10 não mostrou uma mudança num ou noutro, mas a fracção de células que eram positivas foi mais elevada do que com o scFv em peso (Figuras 16E e 16F). Como mostrado nas Figuras 16E e 16F, perto de 100% de células mut10 foram positivas para cada um dos agentes testados. Isto contrasta com cada um dos outros mutantes (por exemplo, ver Mut4 e mut7), que se assemelhava ao peso da levedura scFv-KJ16 em exibir duas populações distintas de células, uma com níveis reduzidos de superfície celular scFv. Maior estabilidade do plasmídeo mut10 e falhas repetidas no resgate do plasmídeo de expressão de mut10 em *E. coli* indicam que a integração cromossômica ocorreu com este plasmídeo mutante. Assim, as características de expressão de superfície modificada de mut10 parecem ser uma consequência da integração do plasmídeo de expressão.

A afinidade de ligação para scTCR foi estimada para os mutantes indicados na Figura 16 por meio de titulação com scTCR biotinilado solúvel (Figura 17). O ajuste de curva não-linear destes dados indica K_D inalterado para mut4 e mut10, mas uma afinidade triplicada para mut7. O aumento na fluorescência média de mut 10 é devido à ausência de uma cauda não fluorescente na distribuição, em vez de uma maior ligação scTCR, como é evidente nas Figuras 16E e 16F.

EXEMPLO 32

Sequências de scFv mutante

As sequências de nucleótidos do scFv-KJ16 em peso clonado no plasmídeo de levedura de exibição, e mut4 e mut7 seguinte ao resgate dos plasmídeos de levedura foram determinadas (Figura 18). O peso scFv-KJ16 continha duas alterações silenciosas da sequência de scFv originalmente publicada (Cho et al., 1995). Estas podem ter sido introduzidas por PCR antes da clonagem do scFv no plasmídeo de levedura de exibição. A sequência mut4 continha uma mutação e mut7 continha duas mutações. A única mutação em mut4 estava presente no epítipo c-myc (Lys para Glu), consistente com a sua ligação reduzida por um anticorpo anti-c-myc como descrito acima. Mut7 continha uma alteração de Arg para Lys numa região de estrutura da região V_L e a uma alteração de Ser para Arg em CDR1 da cadeia V_L . A segunda mutação é consistente com a maior afinidade de ligação observada para mut7.

A exibição em fagos tem sido utilizada para a seleção de scFv com ligação de antígeno de mais elevada afinidade, assim como o isolamento de novos scFv a partir de bibliotecas ingênuas (Hoogenboom, 1997). No entanto, tem havido dificuldades na expressão de algumas proteínas de

mamíferos em *E. coli*, em parte, devido à toxicidade, enviesamento de códãos, ou problemas de dobragem (por exemplo, Knappik & Pluckthun, 1995, Ulrich et al., 1995, Walker & Gilbert, 1994). A expressão de levedura pode potencialmente evitar alguns destes problemas, oferecendo a vantagem de que as proteínas podem ser expressas com modificações pós-traducionais eucarióticas (por exemplo, glicosilação e isomerização dissulfureto eficiente). Além disso, a exibição de fagos não possui geralmente a precisão quantitativa para discriminar entre os mutantes com afinidade de ligação diferente em menos de cinco vezes (Kretzschmar et al., 1995). Por outro lado, a marcação de fluorescência e triagem permitem o isolamento de clones 4-4-20 scFv com apenas 3 vezes maior afinidade. Uma vez que a maioria das grandes alterações na afinidade de ligação ao antígeno resulta da combinação direta de mutações pontuais, cada uma com efeitos menores (Hawkins et al., 1993, Schier et al., 1996, Yang et al., 1995), a capacidade de identificar os melhoramentos subtis na afinidade poderia ser de grande valia. Com estas vantagens em mente, foi desenvolvida a utilização de um sistema de exibição de levedura para a maturação da afinidade de um receptor scFv de células anti-T.

Um scFv que é específico para a região VB8 de um rato TCR foi usado para gerar reagentes anti-TCR que podem, em última análise aumentar as propriedades alvo das células T *in vivo* (Cho et al., 1997, Cho et al., 1995). O scFv ativo foi expresso como uma proteína de fusão Aga2p na superfície da levedura, com uma afinidade que era semelhante ao scFv nativo (~ 500 nM em comparação com 120 nM para scFv). Para seleccionar maior afinidade scFv, a mutagénese aleatória com um ADN reparado numa estirpe deficiente de *E. coli*

originou uma frequência de mutação de ~ 2 a 3 por 1000 pares de base após seis ciclos de crescimento. A citometria de fluxo com fluorescência de scTCR marcado e anticorpos anti-c-myc foi utilizado para classificar células exibindo scFv com afinidade scTCR aumentada. O anticorpo anti-c-myc foi incluído como um segundo critério de seleção para controlar os mutantes com aumento da ligação de TCR não devido a uma afinidade mais elevada, mas devido a uma maior expressão na superfície celular da fusão scFv-c-myc. Depois de vários ciclos de seleção, foram observados três classes de mutantes fenotípicos: 1) ligação reduzida para o anticorpo c-myc, mas ligação scTCR inalterada (mut1-5 8, 9); 2) ligação aumentada para o scTCR com marcação c-myc, inalterada (mut7); e 3) maior expressão de superfície de eficiência devido à integração cromossômica do vetor (mut10).

O isolamento de classes de mutantes que são representados por mut4 e mut7 poderiam ser previstos a partir dos critérios de seleção ilustrados na Figura 14. Isto é, qualquer célula mutante que foi identificado acima do limite da janela de classificação diagonal pode ser explicada por uma das propriedades descritas por mut4 e mut7, uma vez que um aumento no sinal de scTCR (PE) ou um decréscimo no sinal c-myc (FITC) coloca uma célula na janela de triagem. Isto não representa um problema significativo para esta abordagem, no entanto, devido à disponibilidade de dois marcadores de epítipo independentes. Ao utilizar a marcação HA e c-myc, em ciclos alternados de triagem, o enriquecimento progressivo para a marcação diminuída de um dos marcadores de epítipo não deve ocorrer.

O isolamento de mutantes de marcadores de epítopo destaca um pedido adicional para exposição de superfície de levedura: o mapeamento de epítopos reconhecidos por anticorpos monoclonais. Embora as estratégias alternativas que utilizam bibliotecas de péptidos tenham sido bem-sucedidas a este respeito para epítopos lineares, a abordagem aqui descrita pode ser estendida a epítopos conformacionais. Consequentemente, uma proteína corretamente enrolada pode ser exibida na superfície da célula de levedura e mutagénese aleatória simples como descrito aqui pode ser aplicada para identificar resíduos de epítopo a partir da sequência polipeptídica não-contígua. Uma vez que as proteínas não dobradas são retidas e degradadas pelo aparelho de controlo de qualidade de secreção eucariótica e os níveis de expressão variadas são identificados por HA ou marcação c-myc, a falsa identificação dos resíduos de epítopo deve ser minimizada por este procedimento. A abordagem descrita é substancialmente mais fácil do que a mutagénese de varrimento de alanina.

Não está claro a razão pela qual o mut10 foi enriquecido nesta exibição, uma vez que o receptor da célula T de cadeia única marcado por marcação de c-myc foi inalterado. É possível que a maior fracção das células marcadas positivamente levem este clone para enriquecimento devido ao transbordamento aleatório na janela de classificação. Em qualquer caso, nem scTCR ou a marcação de c-myc foram diferentes para este clone, e rearranjos estruturais do plasmídeo de expressão indicam que se tinha integrado no cromossoma.

A identificação de uma única mutação CDR em mut7 é consistente com a constatação de que este mutante scFv tem ligação aumentada para o receptor de células T. Os esforços futuros para obter apenas scFv com afinidade mais elevada para o receptor de células T (e não mutantes de c-myc) envolve a seleção alternativa com anti-HA e anticorpos anti-c-myc para controlar os níveis de superfície celular de scFv. Esta estratégia, combinada com técnicas de baralhação de ADN entre os mutantes selecionados (Stemmer, 1994), deve permitir o isolamento do scFv-KJ16 com consideravelmente com maior afinidade do que o scFv em peso ($K_D \sim 120$ nM). Tal mutante KJ16 scFv pode ser utilizado para testar fenómenos cinéticos de sinalização de células T, assim como a segmentação da morte mediada de células T por meio de anticorpos biespecíficos (Cho et al., 1997).

A presente memória descritiva mostra o isolamento propositado de anticorpos de afinidade maduros através da exibição da superfície celular. Como descrito acima, a seleção da taxa foi utilizada para identificar mutantes com taxas de dissociação diminuída, ao passo que a expressão de ligação do antígeno equilibrada scFv-KJ16, foi usada. Estas duas abordagens são complementares, e dependem da afinidade de partida de scFv. Para $K_D > 1$ nM, é razoável prosseguir a estratégia de equilíbrio com o antígeno solúvel marcado como as taxas de dissociação seriam demasiado rápidas para permitir a discriminação efetiva da variação cinética. Além disso, a essas afinidades inferiores o antígeno solúvel a granel não é substancialmente empobrecido a partir da mistura de reação marcada, dado que o scFv exibido está presente em concentrações eficazes de cerca de 1-10 nM. Por outro lado, os anticorpos com força de ligação, como 4-4-20 ($K_D =$

0,4 nM) esgotariam os antígenos solúveis marcados em concentrações abaixo de K_D a menos se forem empregues inconvenientemente grandes volumes de marcação. No entanto, a cinética de dissociação de tais anticorpos com força de ligação é lenta o suficiente para permitir a extinção, classificação e análise através de procedimentos de mistura manual. Assim, pode-se empregar uma estratégia pela qual scFv seria maturado por afinidade através de ciclos de triagem e de mutagênese à base de equilíbrio para alcançar $K_D \sim 1$ nM, seguido de ciclos de rastreo da taxa e mutagênese para obter ainda mais melhorias.

A exposição de superfície celular e citometria de fluxo de rastreo permite a seleção de clones de uma biblioteca com base nos parâmetros cinéticos de ligação, tais como K_D e a constante de velocidade de dissociação (k_{diss}). Parâmetros de ligação dos mutantes selecionados podem então ser quantitativamente avaliados in situ no formato de exibição, sem a necessidade de subclonagem ou expressão solúvel, tal como mostrado na Figura 17. Por outro lado, a seleção de anticorpos de fagos exibida envolve frequentemente condições de lavagem e eluição cada vez mais severas, mesmo até ao ponto de pH 2 e 8 M GuHCl. Tal seleção rigorosa tem baixa precisão quantitativa e nem sempre se relaciona diretamente com parâmetros de ligação tais como K_D ou K_{diss} em condições ambientais ou fisiológicas.

Sistemas de exposição de superfície das células bacterianas foram descritos (Gunneriusson et al., 1996) para a manipulação de anticorpos e outras proteínas. Estes sistemas possuem algumas das vantagens do presente sistema de exibição de levedura, apesar de não proporcionarem as capacidades de processamento pós-tradução da via secretora

eucariótica. O acesso de macromoléculas para a proteína exibida em bactérias pode também ser restringido pela barreira de difusão apresentada pela camada de lipopolissacarídeo (Roberts, 1996). Por esta razão, a ligação a antígenos proteicos solúveis ou epítipo de marcação marcado com anticorpos monoclonais não é possível. Sistemas de exposição de superfície, em células de mamífero cultivadas também estão disponíveis, mas a construção e rastreio de bibliotecas combinatórias para esses sistemas não são tão rápidas ou tão versáteis como para a levedura.

Uma biblioteca relativamente pequena (3×10^5) foi rastreada para isolar os mutantes aqui descritos. Isto não representa um limite superior no tamanho da biblioteca de levedura. Bibliotecas de levedura com 10^7 clones foram construídas e mais aumentos no tamanho da biblioteca, se necessário, poderão ser atingidos. A presente memória descritiva mostra que a exposição de superfície de levedura pode ser utilizada para isolar um mutante de scFv, com elevada afinidade e que mutantes com epítopos de mAb alterados podem ser enriquecidos ou excluídos como desejado. Além disso, a K_D pode ser estimada *in situ* no formato de exibição sem necessidade de subclonagem e expressão solúvel. A otimização quantitativa das condições de rastreio permitirá melhorar ainda mais este método. Aplicações de exposição de superfície de levedura estendem-se para além de maturação de afinidade de anticorpos, ao isolamento de domínios de ligação a partir de bibliotecas de expressão de cADN, ou o isolamento de mutantes de receptores ou ligandos, na base direta dos parâmetros cinéticos de ligação e de equilíbrio.

EXEMPLO 33

Exibição e expressão do receptor de células T no sistema de exibição de levedura

A presente descrição também se refere a um novo processo para a manipulação do receptor de células T para melhorar as propriedades de ligação, por exemplo, para os complexos péptido-MHC ou superantigénios. Esta divulgação estabelece um método para a exibição de um receptor de células T num formato de biblioteca de exibição em superfície de levedura. Este método pode ser utilizado: 1) de um modo geral, para expressar polipeptídeos que não são normalmente expressos na superfície ou em levedura, e 2), mais especificamente, para a manipulação de receptores de células T de maior afinidade para um ligando à escolha.

A manipulação de proteínas não atingiu um nível de desenvolvimento que permita a manipulação racional e dirigida de maior afinidade de ligação. Como resultado, as abordagens têm sido desenvolvidas para identificar mutantes melhorados de grandes populações de mutantes. A abordagem mais largamente utilizada é a "exibição por fagos", que utilizada para a manipulação de anticorpos, em especial sob a forma de ligações de anticorpos "de cadeia simples". No entanto, a metodologia de exibição de fagos tem sido incapaz de exibir receptores de células T de cadeia única (scTCRs) com sucesso. Isto é mais provável porque a dobragem de receptores de células T de cadeia simples isolada é muito ineficiente na ausência dos outros componentes do complexo CD3 e da maquinaria de dobragem de proteínas do retículo endoplasmático eucariótico; o periplasma bacteriano é incapaz de dobrar eficazmente estes fragmentos.

O estabelecimento de uma superfície de levedura exibida no receptor de células T é ilustrado nas Figuras 19 a 21. Um melhoramento essencial tem sido isolar um receptor de células T mutante que pode ser exibido no presente sistema. O receptor de células T de tipo selvagem não é funcionalmente exibido, como mostrado pela falta de ligação por um anticorpo (1B2), que é específico para a conformação nativa do receptor de células T (Figura 19). Por mutação do receptor de células T e rastreio de uma biblioteca para a ligação de 1B2, foi identificado um receptor de células T de cadeia simples mutante exibido em levedura. Isto estabelece um sistema que pode agora ser usado para isolar os receptores de células T de cadeia simples mutante com propriedades melhoradas de ligação.

A presente divulgação proporciona um sistema de exibição da superfície celular de levedura de sucesso para expressar o receptor de células T. Em segundo lugar, a expressão do receptor de células T de comprimento total só pode ser obtida após a mutagênese aleatória do gene receptor da célula T e, em seguida, selecionar por citometria de fluxo para expressão de superfície. Este método explora uma abordagem evolutiva para "corrigir" o defeito na expressão do receptor de células T.

Esta mesma abordagem pode ser aplicada a qualquer polipeptídeo que, na sua forma de tipo selvagem não é exibido de forma eficiente. A seleção de "exibição" tem sido reduzida à prática para o receptor de células T, como descrito nos exemplos 33-37. Uma vez que são obtidas as versões mutantes exibidas do polipeptídeo, estas versões podem então ser submetidas aos processos de rastreio para

as propriedades de ligação melhoradas que são descritas nos exemplos 1-32.

Moléculas de receptores de células T melhoradas são úteis em terapias para o cancro, sépsis e doenças autoimunes, tais como artrite, diabetes ou esclerose múltipla. Por exemplo, formas solúveis de receptores de células T de elevada afinidade que atuam como antagonistas de doenças autoimunes prejudiciais mediadas por células T, e assim, proporcionar potenciais tratamentos para estas doenças. Estratégias análogas têm sido utilizadas com êxito com um receptor do factor de necrose tumoral solúvel (TNF-R) e formas deste receptor estão em ensaios clínicos para o choque séptico e artrite reumatoide (Moosmayer et al., 1995).

Nos métodos da presente invenção, a superfície de exibição de levedura permite que os receptores de células T de cadeia simples sejam manipulados para se ligar com elevada afinidade para complexos MHC-péptido ou superantigénios. Tais moléculas podem encontrar uma variedade de utilizações médicas. Exemplos incluem, mas não estão limitados a: 1) interferir com ataques inapropriados de células T no tecido saudável em doenças autoimunes, tais como artrite, diabetes e esclerose múltipla; 2) interferir com o choque séptico devido a superantigénio bacteriano que interage com as células T, levando a reações inflamatórias maciças; e 3) destruição das células tumorais que suportam os ligandos do receptor de células T (por exemplo, péptido de tumor específico/complexos MHC), usando o receptor de células T de alta afinidade juntamente com agentes biespecíficos do anticorpo anti-CD3 para redirecionar as células T para atacar as células cancerosas.

Plasmídeos e estirpes

O gene TCR de cadeia simples (V (8,2)-ligante-V (3.1) do gene unido por um ligante modificado 205 (Cho et al., 1995) foi subclonado por PCR no vector pCR-Script (Stratagene, La Jolla, CA) seguindo o protocolo do fabricante. Um marcador de epítipo 6-His foi incluído no terminal carboxi de scTCR para fins de purificação. O fragmento de ~ 800 pb *NheI/XhoI* contendo o scTCR foi excisado a partir de pCR-Script e ligado no vector de exibição de superfície da levedura pCT202 contendo uma marca de nove resíduos de epítipo (HA) e a grelha de leitura aberta AGA2 a jusante do promotor GAL1 induzível. A construção resultante foi transformada pelo método de transformação de acetato de lítio (LiAc) de Gietz e Schiestl (Gietz et al., 1995) para a estirpe BJ5465 de *S. cerevisiae* (aura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4:His2 prbD1.6 can1 GAL; Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA) contendo um AGA1 cromossomicamente integrado controlado pelo promotor GAL1 (estirpe EBY100).

EXEMPLO 34

Produção de uma biblioteca de mutantes aleatórios scTCR

Aproximadamente 50 ng de pCT202/scTCR foram transformados em células *E. coli* XL1-Red (Stratagene, La Jolla, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Após 1 hora de indução em meio SOC, a recuperação foi centrifugado a 2000 rpm durante 5 min. e ressuspensa em 500 ml de meio líquido LB contendo 100 mg/ml de ampicilina, mais 50 mg/ml de carbenicilina (LB-AMP100-CARB50). A ressuspensão foi adicionada a 15 ml de LB-AMP100-CARB50 num frasco Erlenmeyer de 50 ml e cultivada a 37°C com agitação. A cultura foi reabastecida com 15 ml LB-AMP100-CARB50 fresco em fase mid-log (OD_{600} (0,2-0,4), e depois cultivada para saturação (OD_{600} ~ 1,0-1,1, o que foi considerado um "ciclo" ou ronda de mutação). Uma pequena fracção da cultura (0,75

ml) foi adicionada ao ciclo seguinte (15 ml de LB-AMP100-CARB50). Depois de seis ciclos de crescimento, as preparações de plasmídeo de ADN Wizard® miniprep (Promega, Madison, WI), foram realizadas em 15 ml de cultura. Aproximadamente 10 mg de ADN pCT202/scTCR a partir do ciclo seis foram transformados em cada um dos 10 tubos de estirpe de levedura EBY100 utilizando o método LiAc. As 10 reações foram reunidas após a ressuspensão em 1 ml de ddH₂O/tubo, 1/10000 do conjunto semeadas em placas seletivas para determinar a eficiência da transformação. O tamanho da biblioteca foi de aproximadamente 7×10^6 . Um volume de 50 mL de SD-CAA (glucose 2%, em peso, 0,67% em peso de base de azoto de levedura Difco, 0,5% em peso de casaminoácidos) foi inoculado com o restante da cultura, cultivado durante a noite a 30°C com agitação, passado a OD₆₀₀ = 0,05, e cultivado durante a noite a 30°C a OD₆₀₀ > 1,0. Cinco mililitros de meio de galactose seletivo SG-CAA (em que 2% de galactose substitui a glicose em SD-CAA) foram então inoculados com OD₆₀₀ = 0,5 e cultivados durante a noite a 20°C com agitação durante ~ 20-24 h (1-2 duplicações).

EXEMPLO 35

Seleção de biblioteca mutante de scTCR por separação de células ativadas por fluorescência

As células foram marcadas com 25 mL Mab 1B2 (anti-Vb8.2Va3.1; preparados a partir de fluido de ascites e conjugados de biotina) a uma concentração de 20 mg/ml. As amostras foram classificadas num banco Coulter 753 com uma taxa de eventos de ~ 4000 células/seg. (Flow Cytometry Center, UIUC Biotechnology Center). Um total de 6×10^7 células foi examinado durante a primeira ronda de triagem, com ~ 5% da população recolhida. As células recolhidas foram recultivadas entre as rondas a 30°C em 4 ml de meio de glucose seletivo SD-CAA. Após cerca de 18-20 horas, a

expressão de AGA1 + AGA2-scFv recombinante foi induzida a 20°C, com agitação em 5 ml de SG-CAA. Um total de 3 rondas de classificação foi realizado, com a primeira ronda em modo de enriquecimento (alta recuperação de todos os clones positivos) e as últimas duas rondas em modo de purificação (células negativas coincidentes rejeitadas). Imediatamente após a última ronda, as células recolhidas foram reclassificadas, recolhidas como duas populações separadas ("alta expressão" e "baixa expressão"), e semeadas em placas seletivas para isolar os clones individuais. Vinte clones foram analisados por citometria de fluxo.

EXEMPLO 36

Indução e detecção de mutante scTCR na superfície da levedura

Os clones individuais da biblioteca de triagem pCT202/scTCR foram cultivados durante a noite a 30°C com agitação em 3 ml de SD-CAA seguida de indução em SG-CEA, como descrito acima. As culturas foram colhidas após 20-24 horas (1-2 duplicações) por centrifugação, lavadas com PBS (10 mM de NaPO₄, 150 mM de NaCl, pH 7,3) contendo 0,1% de albumina de soro bovino e 0,05% de azida, e incubadas 45 minutos em gelo com 25 L de 10 mg/ml de anticorpo anti-HA Mab 12CA5 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), ou Mab 1B2 biotinilado (20 mg/ml) preparado a partir de fluido de ascite. As células foram lavadas com PBS e incubadas 30 minutos em gelo ou com F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratinho FITC (1:50, Kirkegaard and Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD) ou um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (1:100; PharMingen, San Diego, CA). As células de levedura marcadas foram analisadas num citómetro de fluxo Coulter Epics XL. A taxa de eventos foi de ~ 250 células/seg. Foram recolhidos dados para 10000 eventos, e a população bloqueada de acordo com a dispersão de luz (tamanho) para

evitar a análise de aglomerados de células. Resultados do TCR de tipo selvagem (peso) e vários mutantes de TCR representativos são mostrados na Figura 19. Os mutantes duplos que contêm as mutações combinadas de vários destes isolados foram também construídos e os resultados de citometria de fluxo destes são mostrados na Figura 20.

EXEMPLO 37

Resgate e sequenciamento de genes mutantes scTCR

Os plasmídeos de levedura scTCR (em peso e 20 mutantes) foram resgatados de acordo com o protocolo descrito por Ward (Ward, 1991), excepto que as células foram rebentadas com um batedor de talão (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) durante 2 minutos, em vez de vórtice. As células foram centrifugadas durante 1 minuto, sendo a fase superior (aquosa) recolhida. Foi utilizado um Kit Wizard® DNA Clean-up (Promega, Madison, WI) para preparar o ADN do plasmídeo e células competentes de *E. coli* DH5a Electromax® (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) foram transformadas por meio de electroporação com 1 ml da preparação de ADN. As transformações foram plaqueadas em LB-AMP50. O sequenciamento de peso scTCR e 20 mutantes (mTCR1-mTCR20) foi realizado utilizando iniciadores que ladeiam o scTCR do vetor de exibição e sequenciamento de fluorescência automatizado (Genetic Engineering Facility do UIUC Biotechnology Center). Foram encontradas mutações individuais no TCR para cada um dos isolados indicados (Figura 21).

EXEMPLO 38

Exibição de superfície e expressão solúvel de mutantes TCR individuais, duplos e triplos

Os mutantes de um único sítio incluíram os seguintes resíduos: VaL43P (mTCR7), VaL104P (mTCR16) e VbG17E (mTCR15). A combinação destas mutações em mutantes duplos ou triplos rendeu a exposição de superfície do scTCR a níveis ainda mais elevados.

Para examinar os scTCRs mutantes selecionados pela exibição de superfície de levedura em mais detalhes, os mutantes individuais (mTCR7, mTCR15, mTCR16), duplos (mTCR7/15, mTCR7/16, mTCR15/16) e triplo (mTCR7/15/16) foram clonados num plasmídeo de secreção de levedura, com uma região pró-pré sintética baseado na sequência de um sinal de consenso (Clements et al., 1991) sob o controlo do promotor GAL 1-10 induzível. As construções foram expressas em levedura e os sobrenadantes resultantes foram monitorizados num ensaio de ligação de 1B2 como uma medida quantitativa da proteína TCR corretamente dobrada. Os níveis de expressão de mutantes de 1B2 scTCR ativas variaram desde níveis indetectáveis para o scTCR de tipo selvagem para o mutante triplo, que expressaram os níveis mais elevados (Figura 22). A ordem dos níveis de secreção foi: mutante triplo> mutantes duplos> mutantes individuais> tipo selvagem. Os mutantes duplos de scTCR selecionados foram purificados por afinidade utilizando uma coluna de anticorpo anti-TCR (KJ16-Affigel) e os níveis de secreção absoluta utilizando o sistema de expressão de cópia baixo foram encontrados como sendo de aproximadamente 100 mg/L.

EXEMPLO 39

Comparação da secreção TCR e níveis de exibição de superfície

A fim de comparar diretamente os níveis segregados de scTCR neste sistema, com os níveis de TCR expressos no sistema de exposição de superfície, os mesmos mutantes foram examinados quanto a fusões Aga-2 em levedura, utilizando citometria de fluxo. O scTCR exibida na superfície de levedura foram marcadas com o anticorpo anti-HA seguido por um anticorpo secundário marcado com fluoresceína e o 1B2 biotinilado, seguido por estreptavidina-ficoeritrina. A intensidade de fluorescência resultante das populações de leveduras foi monitorizada por citometria de fluxo e determinada como um tempo médio de unidades de fluorescência (Figura 23A). O nível de fluorescência variou entre os mutantes individuais, duplos e triplos, mas os níveis relativos eram exatamente os mesmos que com o sistema de secreção de levedura (Figura 23B) (i.e. mutante triplo> mutantes duplos> mutantes individuais> tipo selvagem). Assim, o sistema de exibição de levedura foi capaz de identificar aqueles mutantes TCR que seriam produzidos num sistema de expressão segregável em níveis elevados, selecionando simplesmente aqueles que foram expressos em níveis mais elevados na superfície da levedura.

EXEMPLO 40

Estabilidade térmica de TCRs solúveis

A fim de explorar a propriedade de proteínas que possam controlar a secreção (e exibir) os níveis para o mutante de scTCR, foi investigada a estabilidade do mutante scTCR através da realização de desnaturação térmica. Os sobrenadantes de levedura scTCR foram incubados a várias temperaturas durante uma hora e a atividade da proteína

monitorizada como uma percentagem da atividade de 1B2 que permaneceu. Uma vez que o scTCR de tipo selvagem não foi expresso no sistema de levedura, um scTCR de tipo selvagem redobrado a partir de corpos de inclusão de *E. coli*, foi usado para comparação. Este scTCR foi utilizado como uma proteína de fusão tiorredoxina (TRX-TCR), que é prevista aumentar a estabilidade e solubilidade de uma proteína. Os resultados mostraram que os mutantes simples tinham temperaturas mais elevadas de desnaturação térmica do que o TRX-TCR (Figura 24A). Além disso, os mutantes duplos e triplos foram ainda mais estáveis, tendo temperaturas ainda mais elevadas de desnaturação do que quer o tipo selvagem de TCR ou os mutantes individuais (Figura 24A).

A cinética de desnaturação térmica para o mutante de scTCR foi determinada a 46°C, a fim de comparar as taxas de desnaturação com cada mutante (Figura 24B). Mais uma vez, os sobrenadantes de levedura scTCR e a sua atividade de ligação a 1B2 foram monitorizados para a atividade do TCR, que permaneceu após a incubação durante vários períodos. A taxa de desnaturação térmica foi maior para o TRX-TCR e menor para o mutante triplo, com os mutantes simples e duplos a encontrarem-se na faixa intermediária (Figura 24B). A afinidade purificada TCR15/16 teve cinética de desnaturação térmica semelhante ao determinado para mTCR15/16 medido diretamente no sobrenadante da cultura de leveduras. Isso indica que as proteínas de leveduras endógenas presentes no sobrenadante não afetaram a cinética de desnaturação medida.

Uma correlação direta foi observada quando os valores de TCR nativo remanescentes após uma hora, a 48°C foram plotados contra níveis de secreção para os scTCRs mutantes

(Figura 4 de Shusta et al. = Figura 25). Assim, no caso do TCR, a propriedade intrínseca de estabilidade foi uma previsão fiável da eficiência da secreção e foi diretamente correlacionada com os níveis da superfície das células de levedura do TCR. Por causa desta correlação, o sistema de exibição pode ser utilizado, por seleção para os níveis mais altos da superfície de uma proteína, para isolar as proteínas mutantes que exibem uma maior estabilidade.

EXEMPLO 41

Modificação pós-tradução e exibição de levedura

Os métodos da presente invenção identificaram variantes do 2C scTCR que são facilmente expressos em leveduras e mostram estabilidade térmica significativamente melhorada. Na verdade, os mutantes de sítio único identificados convertidos no que é normalmente um scTCR instável numa scTCR que parece ser tão estável quanto fragmentos de anticorpos dissulfureto "estabilizados" covalentemente ou de cadeia simples quimicamente reticulados (scFv). Isto é especialmente importante para o TCR, que tem potencial como um antagonista para o tratamento de doenças autoimunes. Como a forma heteróloga expressa de TCR do tipo selvagem foi previamente muito instável, a farmacocinética à temperatura fisiológica será importante.

Demonstrou-se que a glicosilação pode resultar num aumento da secreção e da estabilidade térmica da proteína. Por exemplo, a glucoamilase era menos estável que a forma não-glicosilada produzida em *E. Coli* e do que a forma glicosilada produzida na levedura *S. cerevisiae*. Assim, era possível que as estabilidades dos scTCRs produzidos em leveduras, que possuem um local de glicosilação ligada a N na região de Va, seriam superiores ao do TRX-TCR não-

glicosilado produzido em *E. coli*. Contudo, isto é improvável ser a única explicação, como os mutantes duplos e triplos têm maior estabilidade em relação aos mutantes individuais e ambas estas espécies são glicosiladas. Além disso, a expressão do scTCR de tipo selvagem na levedura não foi detectada, embora também seja de esperar que seja glicosilada.

O nível dos vários mutantes scTCRs no sistema de secreção de expressão correlaciona-se completamente com o nível de TCR na superfície do sistema de exibição de levedura. Esta relação pode advir do facto de que ambos os sistemas exigem o mesmo aparelho secretor. Deste modo, as mutações que afectam a dobragem e a estabilidade da proteína podem afectar os mesmos passos de transporte de proteínas para o exterior (isto é, a superfície da célula ou segregada). Esta é uma vantagem distinta de expressar proteínas eucarióticas em leveduras (em comparação com bacteriófagos ou bactérias), uma vez que existem mecanismos de controlo de qualidade para garantir que apenas proteínas devidamente dobradas percorrem todo o caminho exocitótico.

Níveis de expressão de mutantes scTCR também estão correlacionados com a desnaturação térmica. Este efeito é semelhante ao observado com o inibidor de tripsina pancreática bovina, em que as mutações que resultaram num aumento das estabilidades também conduziram a um aumento dos níveis de secreção de levedura. Esta correlação apoia a teoria de que uma proteína que tem maior estabilidade na forma dobrada é mais susceptível de ser adequadamente embalado e exportada a partir da célula em vez de ser retida e degradada pelo mecanismo de controlo de qualidade eucariótica. É claro que muitos outros fatores, como a

taxa de dobragem para a frente, formação de ligação dissulfeto, e associação com assistentes de dobradura de proteínas do retículo endoplásmico também desempenham papéis importantes. No entanto, como a presente invenção demonstra, a estabilidade térmica parece ser uma boa medida da competência de secreção para uma molécula anteriormente instável e mal segregada tal como o TCR.

Com base nos resultados aqui apresentados, pode-se prever uma metodologia através da qual uma proteína que é fracamente expressa e/ou instável pode evoluir sistematicamente para expressar níveis mais elevados e/ou uma molécula mais estável. O gene que codifica a proteína pode ser mutado de forma aleatória e a biblioteca expressa na superfície da levedura. Uma vez exibida, a população pode ser pesquisada quanto a clones que apresentam altas concentrações de superfície (média de fluorescência devido a uma sonda específica). Tal como foi demonstrado com o scTCR, as variantes com uma maior expressão de superfície tem Potencial para serem moléculas mais estáveis que expressam níveis elevados. Deste modo, A exibição de superfície de levedura pode ser uma ferramenta poderosa para aumentar a estabilidade das proteínas para a cristalização, industrial e aplicações médicas.

As seguintes referências foram aqui citadas:

Bassolino-Klimas, D., et al., Protein Science 1:1465-1476, 1992.

Baumgartner, JD, et al., Immunobiol. 187:464-477, 1993.

Berek, C., et al., Immunol Rev. 96:23-41, 1987.

Bird, RE, et al., ScienceCiência 242:423-426,1988.

Born, et al., (1987) J. Immunol. 138, 999.

Brodnicki, et al., (1996) Mol. Immunol. 33, 253-263.

Brummell, D.A., et al., Biochemis. 32:1180-1187, 1993.

Cappellaro, C., et al., EMBO Journal 13:4737-4744, 1994.

Chang et al., (1994) PNAS USA 91:11408-11412.

Cho, et al., (1997) Bioconj. Chem. 8, 338-346.

Cho, et al., (1995) J. Biol. Chem. 270, 25819-25826.

Choo, Y., & Klug, A. (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6, 431-436.

Clackson, T., et al., Nature 352:624-628, 1991.

Clements, et al., (1991) Gene 106:267-271.

Daniels, D. A., & Lane, D. P. (1996) Methods 9,494-507.

Davis, G.T., et al., Biotechnology 9:165-169,1991.

de Nobel, H., et al., Trends in Cell Biol. 4:42-45,1994.

Deng, S., et al., J. Biol. Chem. 269:9533-9538, 1994.

Denzin, L.K., et al., Mol. Immol. 30:1331-1345, 1993.

DiRienzo, J.M., et al., Ann. Rev. Blochem. 47: 481-532, 1978.

Droupadi, P.R., et al., J. Mol. Recog. 5:173-179,1993.

Eilat et al., (1992) PNAS USA 89:6871-6875.

Ellman, et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2779-2782.

Engel et al., (1992) Science 256:1318-1321.

Fischman, A.J., et al., J. Nucl. Med.. 34:2253-2263, 1993.

Foote, J., et al., Nature 352: 530-532, 1991.

Francisco, S.A., et al., PNAS 90:10444-10448,1993.

Garrard, L.J., et al., Gene 128: 103-109, 1993.

Georgiou, et al., (1997) Nat. Biotechnol. 15, 29-34.

Gilli, P., et al., J. Phys. Chem. 98:1515-1518, 1994.

Gilson, M.K., et al., Proteins:Struc., Func., Genet. 3:32-52, 1988.

Goldenberg, D.M. et al., Am. J. Med. 94:297312,1993.

Goldenberg, D.M., et al., Int. J Oncol. 3:5-11, 1993.

Greener, A., et al., Strat. in MoL Biol. 7: 32-34, 1994.

Guddat, L.W., et al., J. Mol. Biol. 236:247-274, 1994.

Gunther, R., et al., J. BioL Chem. 268: 7728-7732, 1993.

Hammond, C., Helenius, A. Curr. Opin. Cell Biol. 5:523-529, 1995.

Hand, P.H., et al., Cancer 73:1105-1113,1994.

Hawkins, R.E., et al., J. MoL BioL 234; 958-964,1993.

Hawkins, R.E., et al., Mol. Riol. 226: 889-896, 1992.

Herron, J.N., et al., Biochemistry 25:4602-4609, 1986.

Hibbits, K.A., et al., Biochemistry 33:3584-3590, 1994-

Hilzemann, R. TIPS 9:408-411, 1988.

Holland, J.I. Adaptation in Natural and Artificial Systems, MIT Press, Cambridge, 1992.

Holst, M., et al., Proteins: Struct., Func., & Gen. 18:231-245, 1994.

Horwitz, A.H., et al., PNAS 85: 8678-8682, 1988.

Huse, W.D., et al., Science 246: 1275-1291, 1989.

Huston, J.S., et al., PNAS 85:5879, 1988.

Ishikawa, E., et al., J. Clin. Lab. Anal. 7:376-393, 1993.

Johnsson, N., et al., Cell, in press, 1994.

Johnston, M., et al., Mol. Cell. Biol. 4:1440-1448, 1984.

Kang, A.S., et al., PNAS 88:11120-11123, 1991.

Kappler et al., (1994) PNAS USA 91:8462-8466.

Kelley, R.F., et al., Biochemistry 32:6828-6835, 1993.

Kozack, R.E., et al., Protein Sci. 2:915-926, 1993.

Kranz, D.M., et al., J. Biol. Chem. 257:6987-6995, 1982.

Kricka, L.J. J, Clin. Immunoassay 16:267-271, 1993.

Lipke, P.N., et al., Microbiol, Rev. 56:180-194, 1992.

Low, N. M., et al., J. Mol. Biol. 260:359-368, 1996.

Lu, C.-F., et al., J. Cell Biol. 128:333-340, 1995.

Mallender, W.D., et al., J. Biol Chem. 269: 199-206, 1994.

Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M., Ward, A.C. Nucl. Acids. Res. 18:5319, 1991.

Winter, G. "By-Passing Immunization: Building High Affinity Human Antibodies by Chain Shuffling." Biotechnology 10:779-783, 1992.

Marks, J.D., et al., J. Biol Chem. 267: 16007-16010, 1992.

McKearn, T.J. Cancer 71:4302-4313, 1993,

Miettinen, M. Ann. Med. 25:221-233, 1993.

Moks, T., et al., Biochemistry 26:5239-5244, 1987.

Mukkur, T.K.S. CRC Crit. Rev. Biochem. 16:133-167, 1984.

Muller, G.W., et al., J. Med. Chem. 35:740-743, 1992.

Near, R.I., et al., Mol Immunol, 30: 369-377, 1993.

Necker et al., (1991) Eur. J. Immunol. 21:3035-3040.

Nell, L.J., et al., Biopolymers 32: 11-21, 1992.

Normington, K., et al., Cell 57:1223-1236, 1999.

Novotny et al., (1991) PNAS USA 88:8646-8650.

Omelyanenko, V.G., et al., Biochemistry 32:10423-10429, 1993.

Riechmann, L., et al., Biochemistry 32:8848-8855, 1993,

Riechmann, L., et al., Mol Biol. 224:913-918, 1992.

Roberets, S., et al., Nature 328:731-734, 1987.

Roy, A., et al., Mol. Cell. Biol. 11:4196-4206, 1991.

Rumbley, C.A., et al., J. Biol. Chem. 268: 13667-13674,1993.

Schreuder, M. P., et al., Yeast 9:399-409, 1993.

Schreuder, M. P.,et al., Trends Biotechnol. 14:115-120, 1996.

Searle, M.S., et al., Anals de Quimica 89:17-26, 1993.

Serafini, A.N. J. Nucl. Med. 34:533-536, 1993.

Sigurskjold, B.W., et al., Eur. J. Biochem. 197:239-246,1991.

Slanetz et al., (1991) Eur. J. Immunol. 21:179-183.

Soo Hoo et al., (1992) PNAS USA 89:4759-4763.

Stemmer, W.P.C. Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 91:10747-10751, 1994 a.

Stemmer, W.P.C. Nature .370:389-391, 1994 b.

Stemmer, W.P.C.et al., BioTechniquesl 4:256-265,1993.

Ward, M., et al., Biotechnology 8:435-440, 1990.

Ward et al. (1991) Scand. J. Immunol. 34:215-220.

Williams, D.H., et al., PNAS 90:1172-1178,1993.

Wood, C.R., et al., Nature 314:446-449, 1985.

Wulfing et al. (1994) J. Mol. Biol. 242:655-669.

Yaimush, M., et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys. 10:197-252, 1993.

Yarmush, M.L., et al., *Biotech. Adv.* 10:413-446, 1992.

Zaccolo, M., et al., *Int. J. Clin. Lab. Res.* 23:192-198, 1993.

Zebedee, S.L., et al., *PNAS* 89-.3175-3179, 1992.

Gietz, et al., (1995) *Yeast* 11, 355-360.

Gunneriusson, et al., (1996) *J. Bacteriol.* 178, 1341-1346.

Hoogenboom, H. R. (1997) *Trends Biotechnol.* 15, 62-70.

Knappik, A., & Pluckthun, A. (1995) *Prot. Eng.* 8, 81-89.

Kretzschmar, et al., (1995) *Anal. Biochem.* 224, 413-419.

Ladner, R. C. (1995) *Trends Biotechnol.* 13, 426-430.

Lowman, et al., (1991) *Biochemistry* 30, 10832-10838.

Markland, et al., (1996) *Methods Enzymol.* 267, 28-51.

Matthews, D. J., & Wells, J. A. (1993) *Science* 260, 1113-1117.

McDuffie, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8728.

Patten, et al., (1996) *Science* 271, 1086-1091.

Petsko, G. (1996) *Nature* 384 (Supplement), 7-9.

Phizicky, E. M., & Fields, S. (1995) *Microbiol. Rev.* 59, 94-123.

Rabinowitz, et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1401-1405.

Roberts, I. S. (1996) *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 285-315.

- Rode, et al., (1996) *Biotechniques* 21, 650.
- Roehm, et al., (1985) *J. Immunol.* 135, 2176.
- Schier, et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 263, 551-567.
- Schlueter, et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 256, 859-869.
- Schodin, et al., (1996) *Mol. Immunol.* 33, 819-829.
- Thompson, et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 256, 77-88.
- Ulrich, H. D., Patten, P. A., Yang, P. L., Romesberg, F. E., & Schultz, P. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11907-11911.
- Walker, K. W., & Gilbert, H. F. (1994) *J. Biol. Chem* 269, 28487-28493.
- Wang, C. I., Yang, Q., et al. (1996) *Methods Enzymol.* 267, 52-68.
- Yang, et al., (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 392-403.
- Yelton, et al., (1995) *J. Immunol.* 155, 1994-2004.

Quaisquer patentes ou publicações mencionadas nesta especificação são indicativas dos níveis dos especialistas na técnica à qual pertence a invenção.

Um perito na técnica apreciará rapidamente que a presente invenção está bem adaptada para realizar os objectivos e obter os fins e vantagens mencionadas, assim como aqueles que lhe são inerentes. Os presentes exemplos, juntamente com os métodos, procedimentos, moléculas, e compostos

específicos aqui descritos são presentemente representativos de formas de realização preferidas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Wittrup et al.

<120> exibição à superfície de células de leveduras de proteínas e suas utilizações

<130> D6061PCT

<141> 1999-01-20

<150> 09/009,388

<151> 1998-01-20

<160> 26

<170> WORD 6.0.1 para Macintosh

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Epítipo marcado

<400> 1

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Epitope tag

<400> 2

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

5

10

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Epitope tag

<400> 3

Asp Thr Tyr Arg Tyr Ile

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown
<220>
<223> Epitope tag
<400> 4

Thr Asp Phe Tyr Leu Lys
5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Epitope tag
<400> 5

Glu Glu Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Epitope tag
<400> 6

Lys Pro Pro Thr Pro Pro Pro Glu Pro Glu Thr
5 10

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Epitope tag
<400> 7

His His His His His His
5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Epitope tag
<400> 8

Arg Tyr Ile Arg Ser
5

<210> 9

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Epitope tag
 <400> 9

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

5

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> PCR primer towards AGA2 gene of *S. cerevisiae*
 <400> 10
 attagaattc cctacttcat acatttcaa 30
 <210> 11
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> PCR primer towards AGA2 gene of *S. cerevisiae*
 <400> 11

attactcgag ctattactgc agagcgtagt ctggaacgtc gtatgggtaa 50
 aaaacatact gtgtgtttat ggg 73

<210> 12
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> PCR primer towards the factor Xa recognition sequence
 <400> 12

tgcacgattg aaggtagata cccatacgc gttccagact acgctctgca 50
 gtaatagatt atcctcgagc t 71

<210> 13
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> PCR primer towards the factor Xa recognition sequence
 <400> 13

cgaggataat ctattactgc agagcgtagt ctggaacgtc gtatgggtat 50
 ctaccttcaa tcg 63

<210> 14
 <211> 10
 <212> DNA

```

<213> Artificial sequence
<220>
<223> PCR primer towards Gal promoter
<400> 14
aattggtacc      10
<210> 15
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> PCR primer towards Gal promoter
<400> 15
gatcgaattc      10
<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> PCR primer towards 4-4-20 scFv
<400> 16
ggttgcccaa gctagcgaag tcgtatgac tcaa      34
<210> 17
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> PCR primer towards 4-4-20 scFv
<400> 17

          ggccggccaa ctcgagctat tacaagtett cttcagaaat aagcttttgt 50
          tctgaggaga cggtgactga                                     70

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> PCR primer towards AGA1 gene of S. cerevisiae
<400> 18
attagaattc agctaaaaaa accaaaaaat      30
<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> PCR primer towards AGA1 gene of S. cerevisiae
<400> 19
attactcgag ctattactg aaaattacat tgc      33
<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Linker between PCR products to maintain correct reading frame
<400> 20

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
5 10 15

<210> 21
<211> 1172
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Cloned PCR products to produce AFA2-HA-4-4-20 gene cassette
<400> 21

```

attagaattc cctacttcat acattttcaa ttaagatgca gttacttcgc 50
tgtttttcaa tattttctgt tattgcttca gtttttagcac aggaactgac 100
aactatatgc gagcaaatcc cctcaccaac tttagaatcg acgccgtact 150
ctttgtcaac gactactatt ttggccaacg ggaaggcaat gcaaggagtt 200
tttgaatatt acaaatcagt aacgtttgtc agtaattgcg gttctcacc 250
ctcaacaact agcaaaggca gcccataaa cacacagtat gtttttaagg 300
acaatagctc gacgattgaa ggtagatacc catacgacgt tccagactac 350
gctctgcagg ctagcgacgt cgttatgact caaacaccac tatcacttcc 400
tgttagtcta ggagatcaag cctccatctc ttgcagatct agtcagagcc 450
ttgtacacag taatggaaac acctatttac gttggtacct gcagaagcca 500
ggccagtctc caaaggctct gatctacaaa gtttccaacc gattttctgg 550
ggtcccagac aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcacactca 600
agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gagtttattt ctgctctcaa 650
agtacacatg ttccgtggac gttcgggtga ggcaccaagc ttgaaattaa 700
gtcctctgct gatgatgcta agaaggatgc tgctaagaag gatgatgcta 750
agaaagatga tgctaagaaa gatggtgacg tcaaactgga tgagactgga 800
ggaggcttgg tgcaacctgg gaggccatg aaactctcct gtgttgcttc 850
tggattcact tttagtgact actggatgaa ctgggtccgc cagtctccag 900

agaaaggact ggagtgggta gcacaaatta gaaacaaacc ttataattat 950
gaaacatatt attcagattc tgtgaaaggc agattcacca tgtcaagaga 1000
tgattccaaa agtagtgtct acctgcaa atgaacactta agagttgaag 1050
acatgggtat ctattactgt acgggttctt actatggtat ggactactgg 1100
ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca gaacaaaagc ttatttctga 1150
agaagacttg taatagctcg ag
1172

```

<210> 22
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> PCR products of wild type scFv-KJ16
<400> 22

```

gacgtcctgg tgacccaaac tctgcctcc ctgtctgcat ctccggatga 50
atctgtcacc atcacatgcc aggcaagcca ggacattggg acttcgtag 100
tttggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt 150
gcaactatct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtagatc 200
tggcacacag tattctctta agatcaacag actacagggt gaagatattg 250
gaacctatta ctgtctacag gtttctagtt ctccgtacac gtttggagct 300
ggcaccaagc tggagctcaa acggtcctca gaacaaaagc ttatttccga 350
agaagatttg tagtaa 366

```

<210> 23
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> PCR products of KJ16-mut4
 <400> 23

```

gacgtcctgg tgacccaaac tctgcctcc ctgtctgcat ctccggatga 50
atctgtcacc atcacatgcc aggcaagcca ggacattggg acttcgtag 100
tttggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt 150
gcaactatct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtagatc 200
tggcacacag tattctctta agatcaacag actacagggt gaagatattg 250
gaacctatta ctgtctacag gtttctagtt ctccgtacac gtttggagct 300
ggcaccaagc tggagctcaa acggtcctca gaacaagagc ttatttccga 350
agaagatttg tagtaa 366

```

<210> 24
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> PCR products of KJ16-mut7
 <400> 2,4

```

gacgtcctgg tgacccaaac tctgcctcc ctgtctgcat ctccggatga 50
atctgtcacc atcacatgcc aggcaagcca ggacattggg acttcgtag 100
tttggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt 150
gcaactatct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtaaata 200
tggcacacag tattctctta agatcaacag actacagggt gaagatattg 250
gaacctatta ctgtctacag gtttctagtt ctccgtacac gtttggagct 300
ggcaccaagc tggagctcaa acggtcctca gaacaaaagc ttatttccga 350
agaagatttg tagtaa 366

```

<210> 25
 <211> 747
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Sequence showing mutations in T-cell receptor
 <400> 25

```

gacgtcgcag tcacccaaag cccaagaaac aaggtggcag taacaggagg 50
aaaggtgaca ttgagctgta atcagactaa taaccacaac aacatgtact 100
ggtatcggca ggacacgggg catgggctga ggctgatcca ttattcatat 150
ggtgctggca gcaactgagaa aggagatata cctgatggat acaaggcctc 200
cagaccaagc caagagaact tctccctcat tctggagttg gctacccccc 250
ctcagacata agtggtacttc tgtgccagcg gtgggggggg caccttgtag 300
tttgggtggg gcacccgact atcggtgcta tctccgcgg atgatgctaa 350
gaaggatgct gctaagaagg atgatgctaa gaaagatcat gctaagaaag 400
atgcacagtc agtgacacag cccgatgctc gcgtcactgt ctctgaagga 450
gcctctctgc agctgagatg caagtattcc tactctgaga caccttatct 500
gttctgggat gtccagtacc cgcggcaggg gctgcagctg ctctcaagt 550
actattccgg agaccagtg gttcaaggag tgaatggctt tgaggctgag 600
ttcagcaaga gcaactcttc cttccacctg cggaaagcct ccgtgcactg 650
gagcgactcg gctgtgtact tctgtgctgt gagcggcttt gcaagtgcgc 700
tgacatttgg atctggcaca aaagtcattg ttctaccata catctag 747

```

<210> 26
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Epitope tag
 <400> 26
 Ile Glu Gly Arg

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a seleção de proteínas com propriedades fenotípicas melhoradas relativos às de um tipo selvagem da referida proteína, compreendendo as etapas de:
transformação de células de levedura com um vector que expressa uma proteína de fusão a ser testada para uma proteína de parede celular de levedura, em que a mutagénese é utilizada para gerar uma população variada de mutantes da proteína a ser testada;
marcação das referidas células de levedura com um primeiro marcador, em que o referido primeiro marcador se associa com a levedura que expressa a referida proteína a ser testada e não se associa com a levedura que não expressa a referida proteína a ser testada;
isolamento das referidas células de levedura com as quais o referido primeiro marcador está associado;
análise e comparação das referidas propriedades fenotípicas da referida proteína mutante expressa pela levedura com características fenotípicas da dita proteína do tipo selvagem; e
seleção das células de levedura que apresenta proteínas mutantes com propriedades fenotípicas aprimorados em relação à proteína de tipo selvagem;
em que as propriedades fenotípicas melhorados são uma ou mais de nível de expressão na superfície, estabilidade, níveis de secreção e solubilidade.
2. Método da reivindicação 1, em que a referida proteína a ser testada é um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo Fab, Fv ou scFv.

3. Método da reivindicação 1, em que a referida proteína a ser testada é o domínio de ligação ao ligando de um receptor da superfície da célula.
4. Método da reivindicação 3, em que o referido receptor da superfície celular é um receptor de células T.
5. Método da reivindicação 1, em que a proteína a ser testada é fundida pelo seu terminal N para o terminal C da referida proteína de parede celular de levedura.
6. Método da reivindicação 1, em que a proteína de parede celular de levedura é uma aglutinina.
7. Método da reivindicação 1, em que a referida levedura é de um género selecionado a partir do grupo que consiste de *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* e *Candida*.
8. Método da reivindicação 1, em que os referidos mutantes da proteína a ser testada são selecionados a partir do grupo que consiste em mutantes individuais e mutantes múltiplos.
9. Método da reivindicação 1, em que o referido primeiro marcador é selecionado a partir do grupo que consiste em partículas magnéticas ligadas a um ligando para a proteína a ser testada e os marcadores fluorescentes.
10. Método da reivindicação 1, em que a seleção de proteínas mutantes de interesse com propriedades fenotípicas melhoradas envolve ciclos iterativos dos referidos passos de transformação e contacto.
11. Método da reivindicação 1, que compreende ainda os passos de:

fazer contactar as referidas células de levedura com um segundo marcador, em que o referido vector utilizado para transformar as referidas células de levedura contém meios para a expressão de uma sequência de polipeptídeo fundido com a referida proteína a ser testada para a produção de um polipeptídeo de fusão e o referido segundo marcador se associa com as células de levedura que expressam o dito polipeptídeo de fusão e não se associa com as células de levedura que não expressam o referido polipeptídeo de fusão; enriquecer uma população de levedura transformada quantificando o referido segundo marcador, em que a ocorrência do referido segundo marcador é diretamente proporcional à abundância dos referidos polipeptídeos de fusão expressos na superfície da célula; e comparar a referida quantificação do referido primeiro marcador à referida quantificação do referido segundo marcador para determinar os níveis de expressão de superfície da referida proteína a ser testada.

12. Método da reivindicação 11, em que um aumento nos referidos níveis de expressão de superfície da referida proteína mutante a ser testada em relação ao nível de expressão de superfície da proteína de tipo selvagem testada pode ser utilizado para selecionar para propriedades fenotípicas desejáveis da referida proteína mutante, onde as ditas propriedades fenotípicas desejadas incluem uma ou mais de nível de expressão intracelular, estabilidade, níveis de secreção e solubilidade.
13. Método da reivindicação 11, em que a referida porção polipeptídica do referido polipeptídeo de fusão

reconhecido pelo referido segundo marcador é um marcador de epítopo.

14. Método da reivindicação 11, em que o referido primeiro marcador e o referido segundo marcador são marcadores fluorescentes.
15. Método da reivindicação 1, que compreende ainda os passos de
clonagem de um gene que codifica as referidas proteínas mutantes selecionadas num vector adaptado para expressão numa célula eucariótica; e
expressar a referida proteína mutante na referida célula eucariótica, em que as referidas propriedades fenotípicas melhoradas da referida proteína mutante são confirmadas por comparação das referidas propriedades fenotípicas melhoradas da referida proteína mutante com as propriedades da referida proteína do tipo selvagem.
16. Método da reivindicação 15, em que a referida célula eucariótica é selecionada do grupo que consiste em células de mamíferos, insectos e de levedura.
17. Método da reivindicação 1, que compreende ainda os passos de:
clonagem de um gene que codifica as referidas proteínas mutantes selecionadas num vector adaptado para expressão num procariota;
e expressar a referida proteína mutante no referido procariota, em que as referidas propriedades fenotípicas melhoradas da referida proteína mutante são confirmadas por comparação das propriedades das ditas propriedades fenotípicas melhoradas da referida

proteína mutante com as propriedades da referida proteína do tipo selvagem.

18. Método da reivindicação 1, em que o referido passo de isolamento é realizado por citometria de fluxo.

RESUMO

**EXIBIÇÃO À SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DE LEVEDURAS DE PROTEÍNAS
E SUAS UTILIZAÇÕES**

A presente invenção proporciona um método genético para prender os polipeptídeos à parede da célula de levedura numa forma acessível para ligação a macromoléculas. Combinando este método com separação de células ativadas por fluorescência proporciona-se um meio de selecionar proteínas com maior ou menor afinidade para uma outra molécula, especificidade alterada, ou ligação condicional. Também é fornecido um método para a fusão genética do terminal N de um polipeptídeo de interesse para o terminal C da parede celular da proteína de levedura Aga2p. A ligação de um fragmento de anticorpo scFv com a aglutinina Aga2p efetivamente imita a exposição de superfície de células de anticorpos por células B do sistema imunitário para a maturação de afinidade in vivo. Mutantes de receptores de células T que são exibidos de forma eficiente na superfície da célula de levedura podem ser isolados por este método, fornecendo um meio para a alteração do receptor de afinidade de ligação e especificidade de células T por rastreamento da biblioteca. O método de seleção também identifica proteínas com características fenotípicas melhoradas, proteínas que são exibidas em níveis mais elevados, proteínas que são segregadas com maior eficiência e proteínas que são mais estáveis.

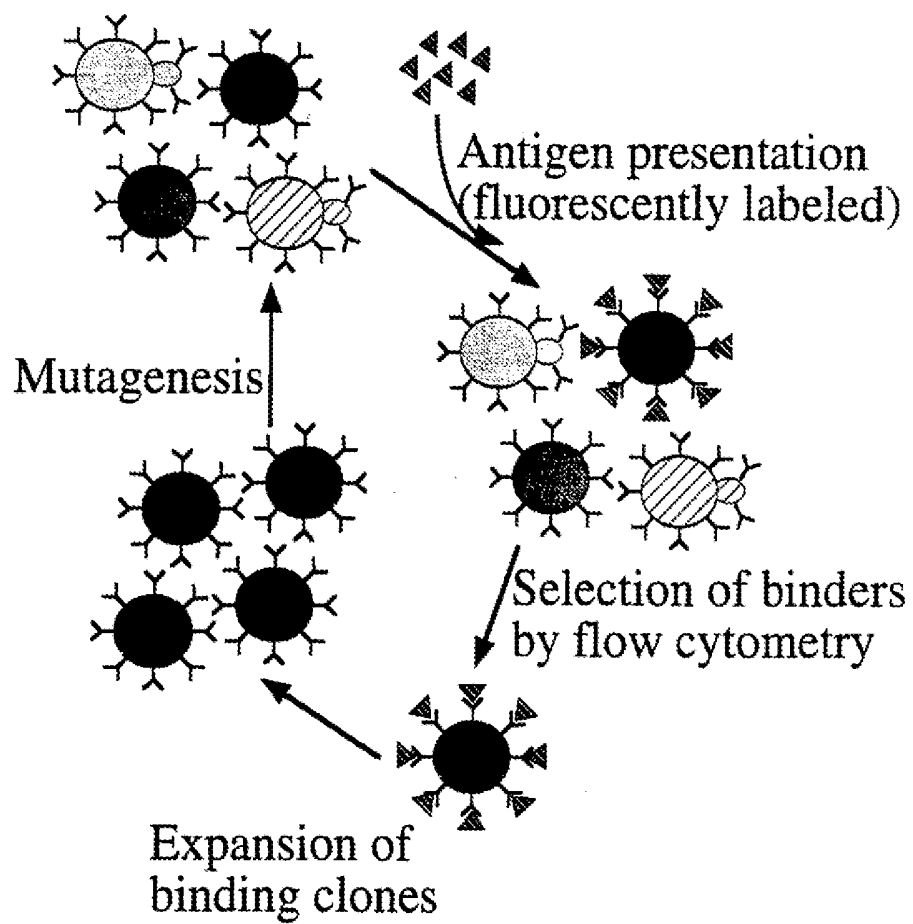


Figura 1

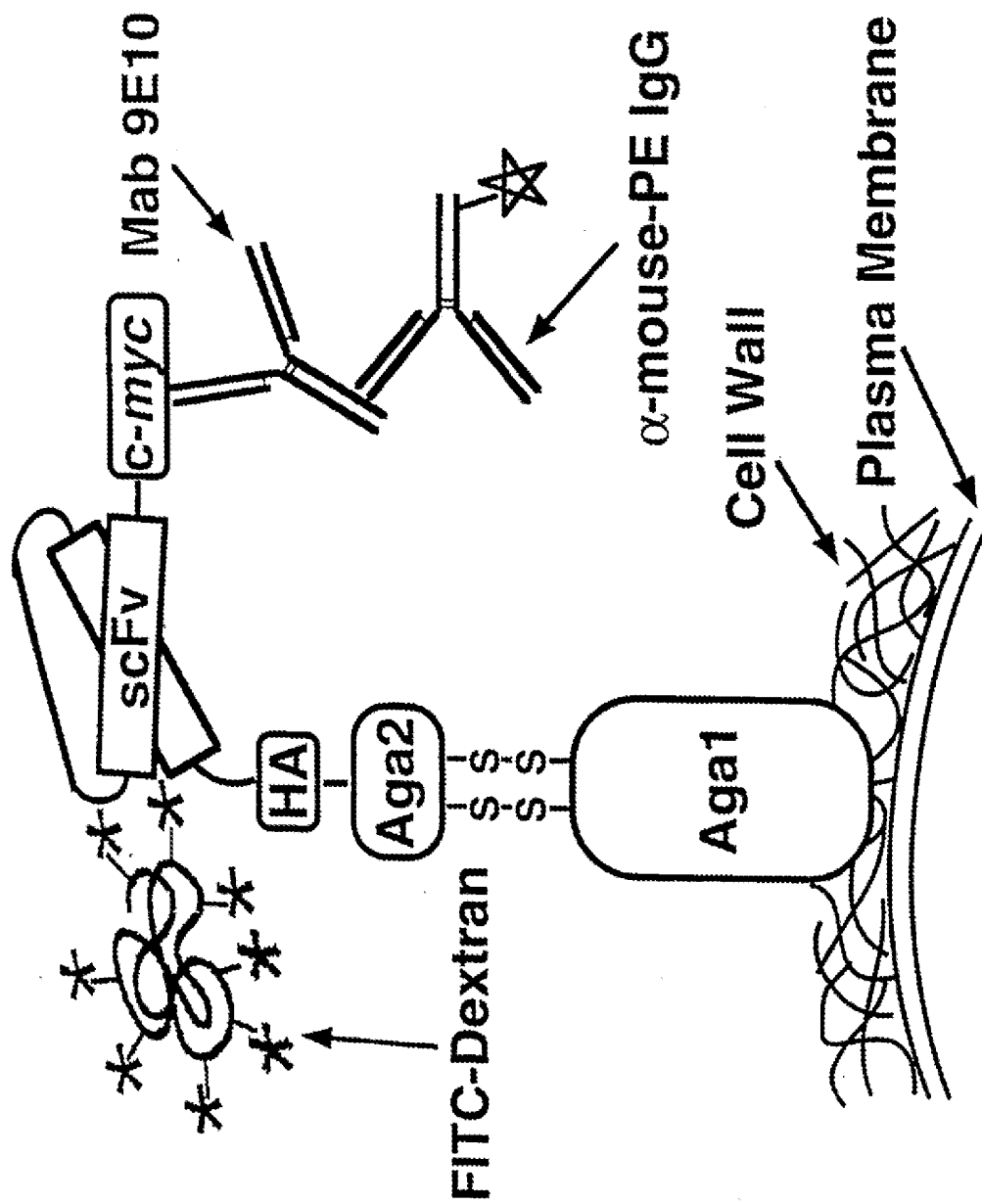


Figura 2

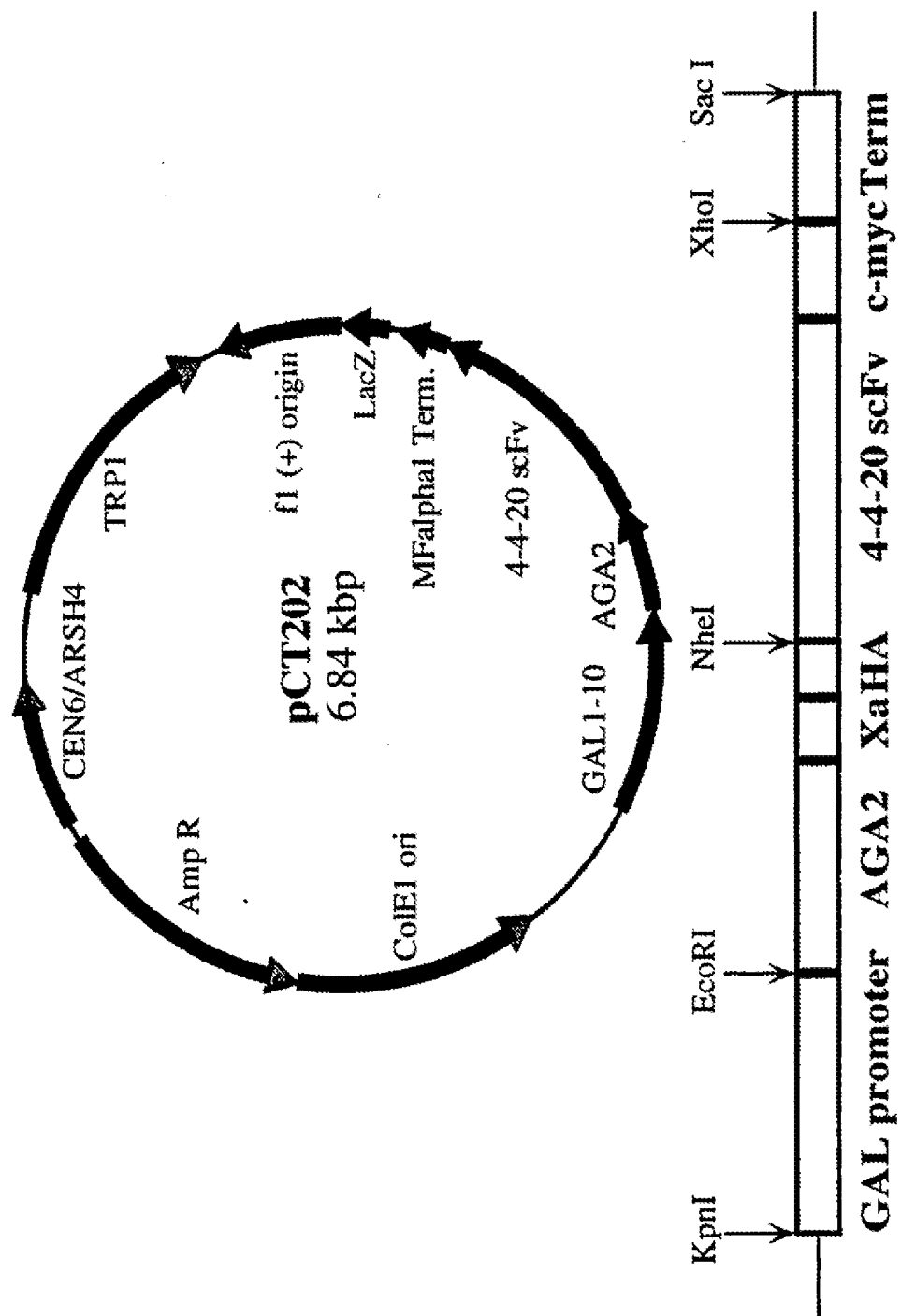


Figura 3

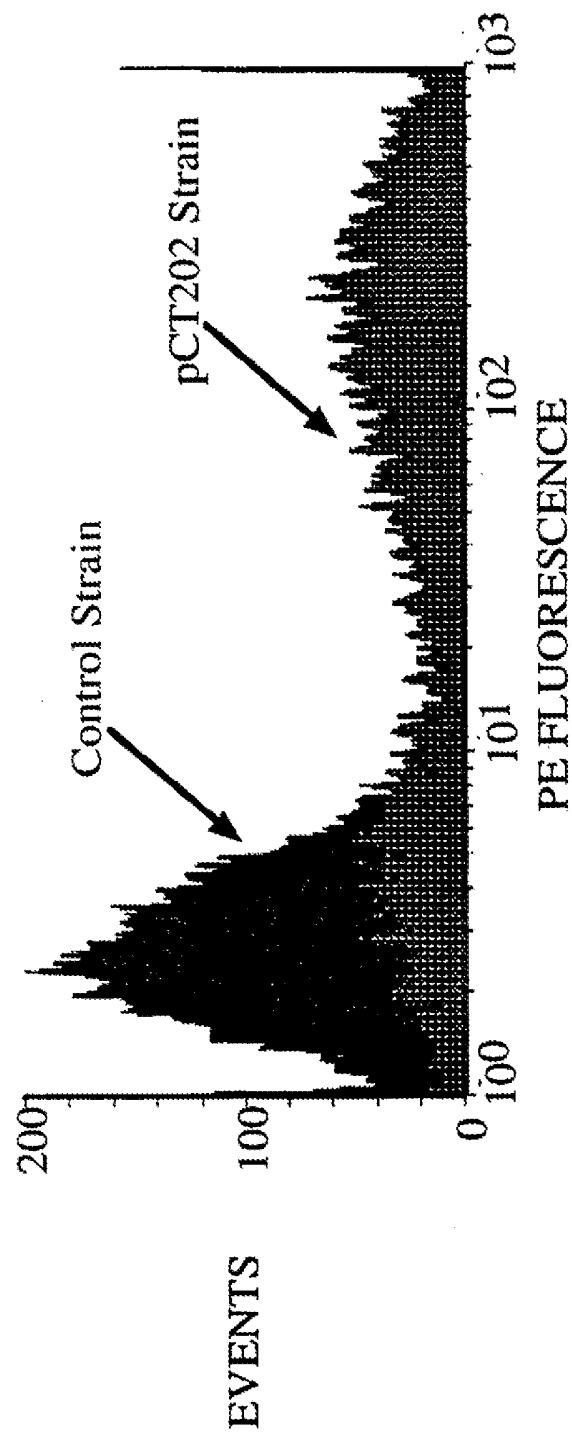


Figura 4

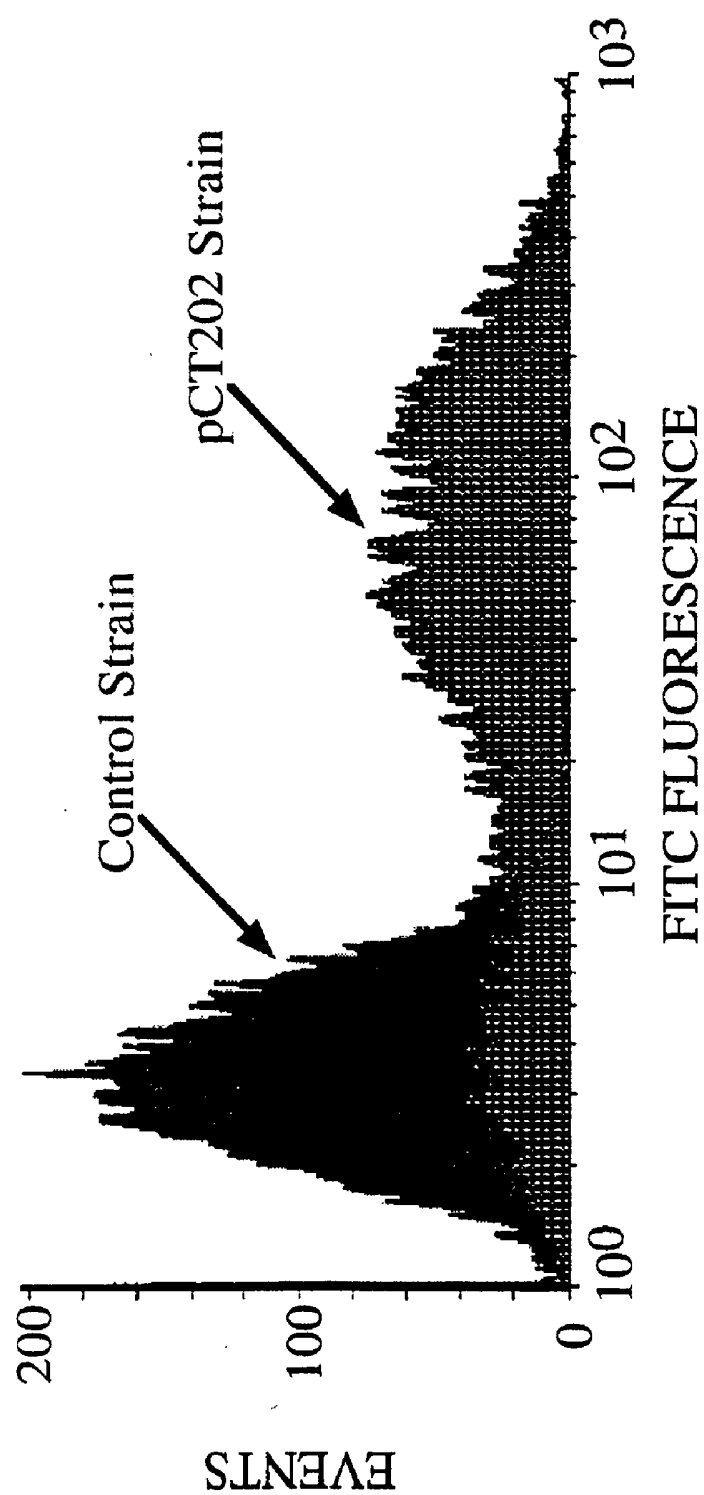


Figura 5

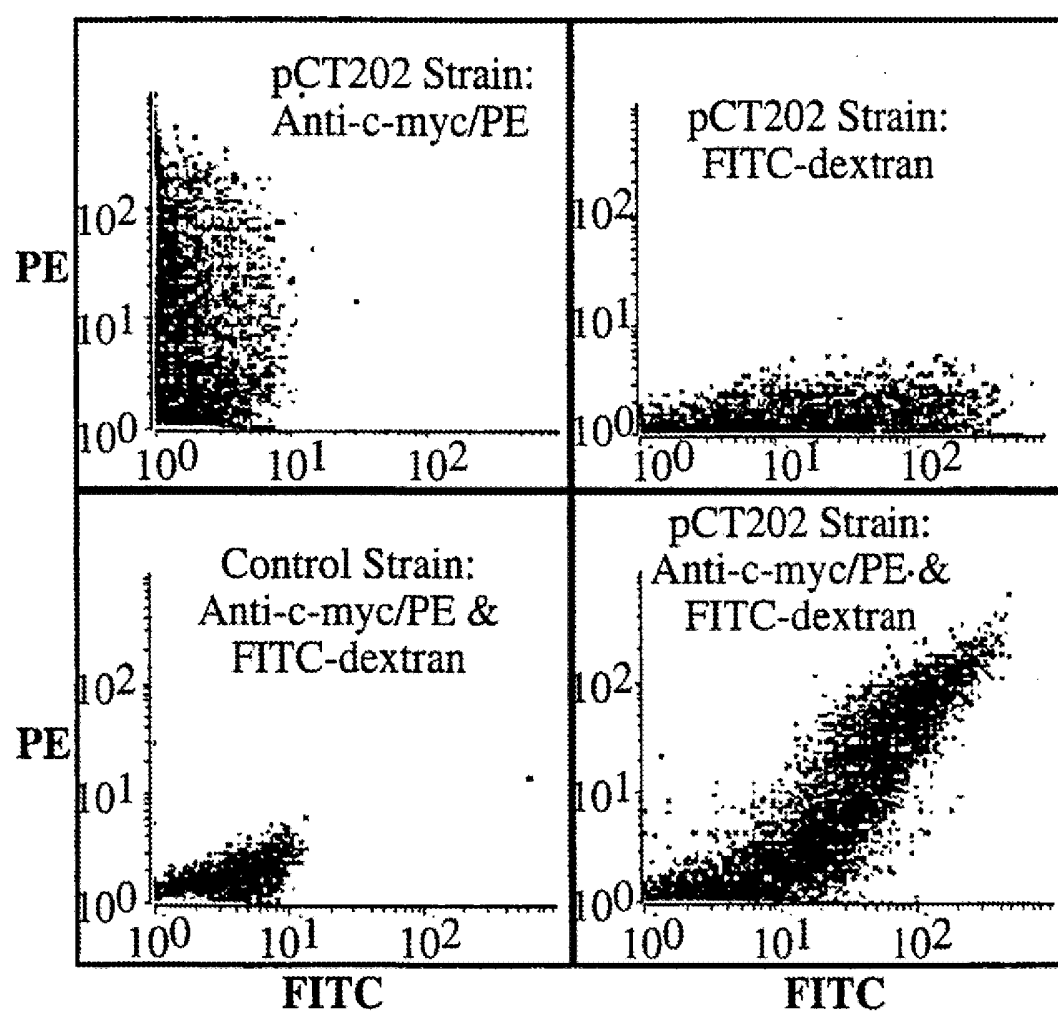


Figura 6

```

1  ATTAGAATTC CCTACTTCAT ACATTTTCAA TTAAGATGCA GTTACTTCGC
51  TGTTTTTCAA TATTTTCTGT TATTGCTTCA GTTTTAGCAC AGGAACTGAC
101 AACTATATGC GAGCAAATCC CCTCACCAAC TTTAGAATCG ACGCCGTACT
151 CTTTGTCAAC GACTACTATT TTGGCCAACG GGAAGGCAAT GCAAGGAGTT
201 TTTGAATATT ACAAATCAGT AACGTTTGTC AGTAATTGCG GTTCTCACCC
251 CTCAACAAC AGCAAAGGCA GCCCCATAAA CACACAGTAT GTTTTTAAGG
301 ACAATAGCTC GACGATTGAA GGTACATACC CATAACGACGT TCCAGACTAC
351 GCTCTGCAGG CTAGCGACGT CGTTATGACT CAAACACCAC TATCACTTCC
401 TGTTAGTCTA GGAGATCAAG CCTCCATCTC TTGCAGATCT AGTCAGAGCC
451 TTGTACACAG TAATGGAAAC ACCTATTTAC GTTGGTACCT GCAGAAGCCA
501 GGCCAGTCTC CAAAGGTCCT GATCTACAAA GTTTCCAACC GATTTTCTGG
551 GGTCCAGAC AGGTTTCAGTC GCAGTGGATC AGGGACAGAT TTCACACTCA
601 AGATCAGCAG AGTGGAGGCT GAGGATCTGG GAGTTTATTT CTGCTCTCAA
651 AGTACACATG TTCCGTGGAC GTTCGGTGGA GGCACCAAGC TTGAAATTAA
701 GTCCTCTGCT GATGATGCTA AGAAGGATGC TGCTAAGAAG GATGATGCTA
751 AGAAAGATGA TGCTAAGAAA CATGGTGACG TCAAACCTGA TGAGACTGGA
801 GGAGGCTTGG TGCAACCTGG GAGGCCCATG AAACCTCTCCT GTGTTGCCTC
851 TGGATTCACT TTTAGTGACT ACTGGATGAA CTGGGTCCGC CAGTCTCCAG
901 AGAAAGGACT GGAGTGGGTA GCACAAATTA GAAACAAACC TTATAATTAT
951 GAAACATATT ATTCAGATTC TGTGAAAGGC AGATTCACCA TGTCAAGAGA
1001 TGATTCCAAA AGTAGTGTCT ACCTGCAAAT GAACAACTTA AGAGTTGAAG
1051 ACATGGGTAT CTATTACTGT ACGGGTTCTT ACTATGGTAT GGACTACTGG
1101 GGTCAAGGAA CCTCAGTCAC CGTCTCCTCA GAACAAAAGC TTATTTCTGA
1151 AGAAGACTTG TAATAGCTCG AG

```

Figura 7

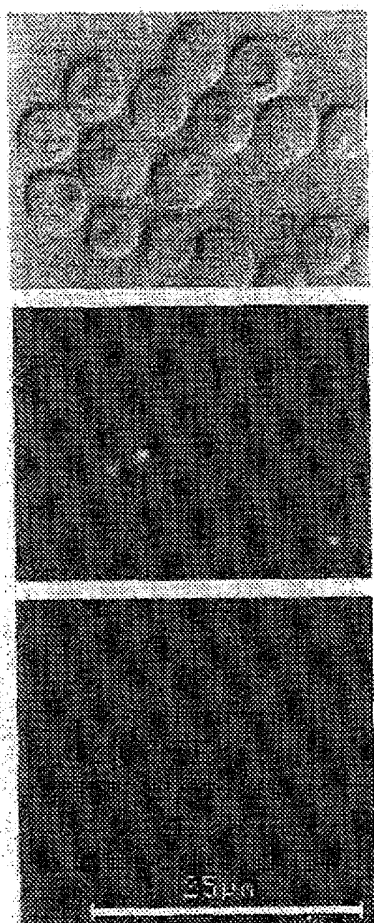


Figura 8A

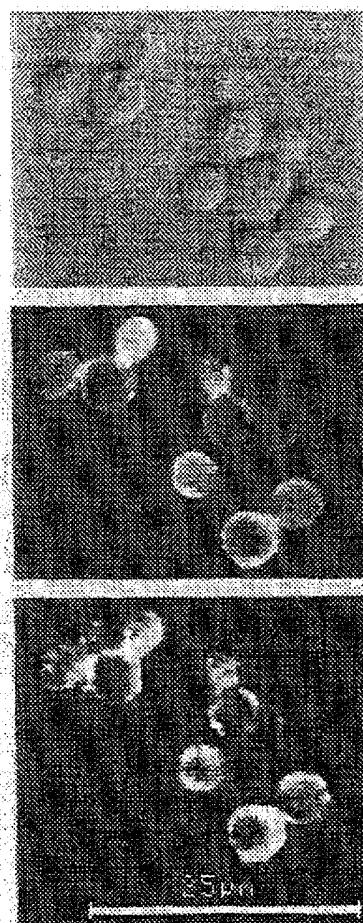


Figura 8B

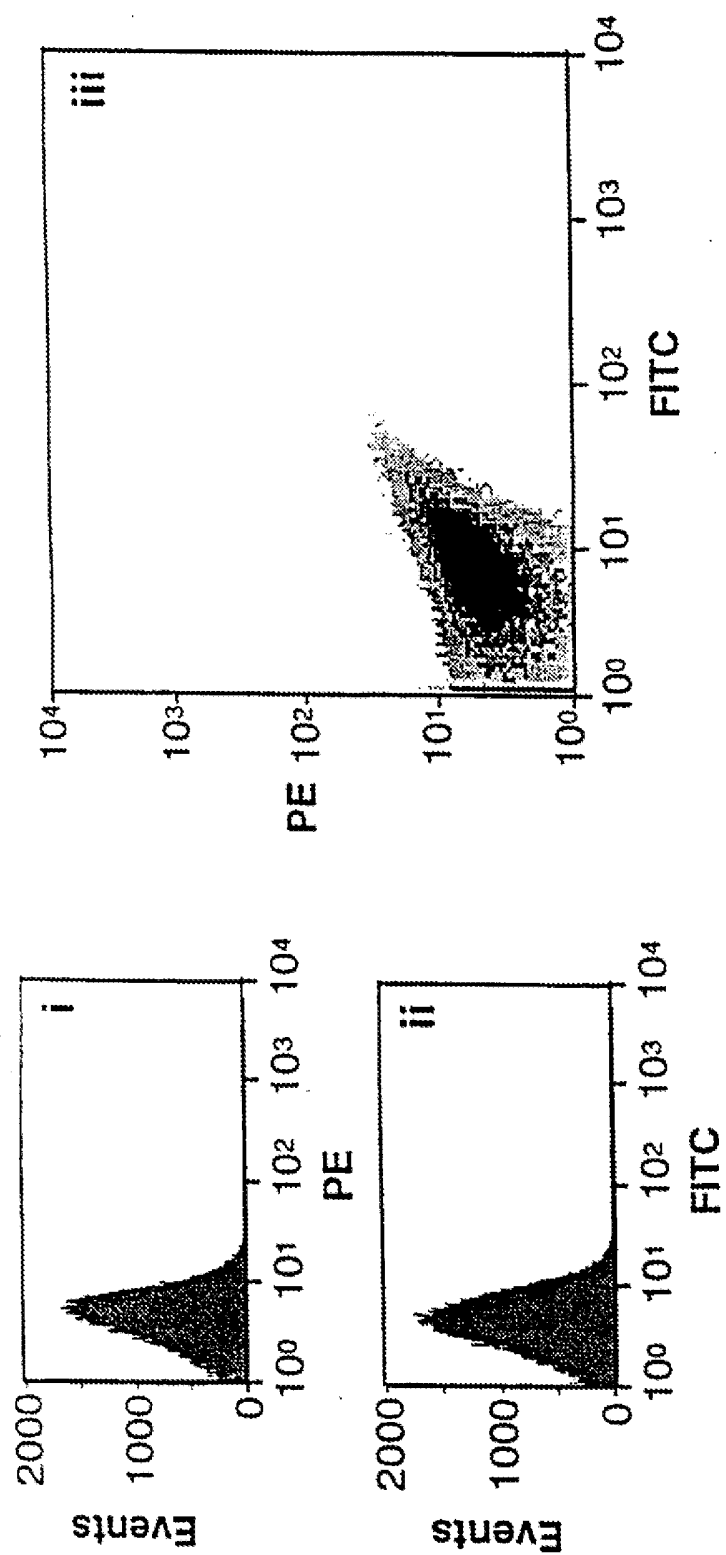


Figura 9A

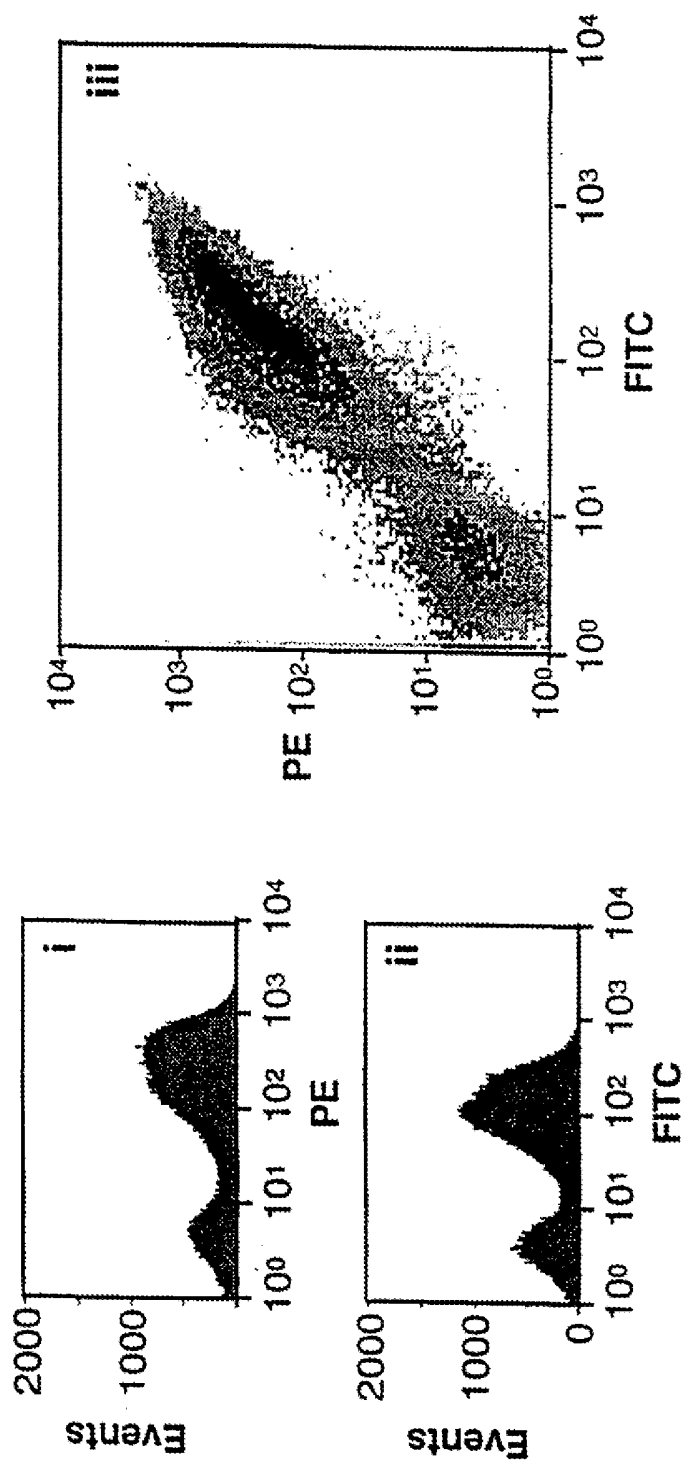


Figura 9B

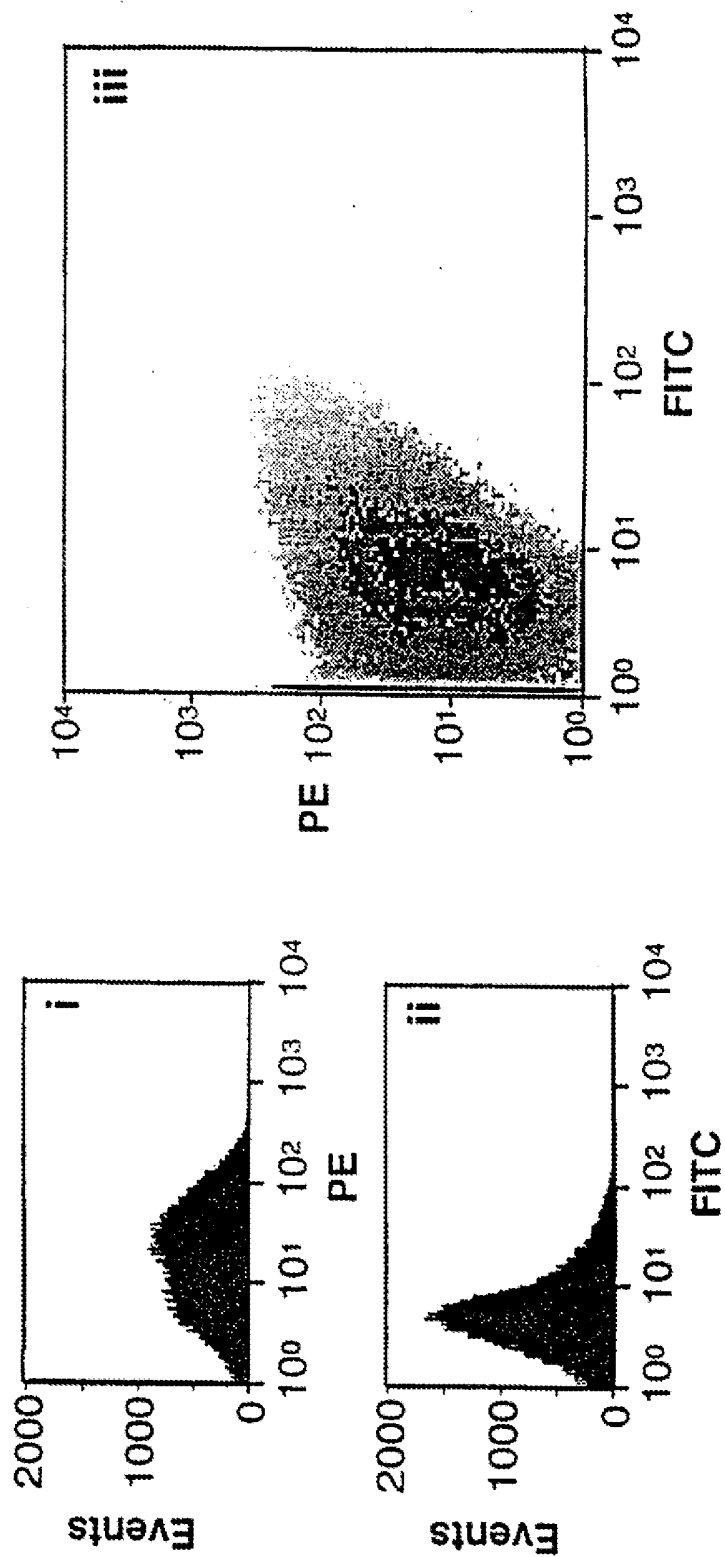


Figura 9C

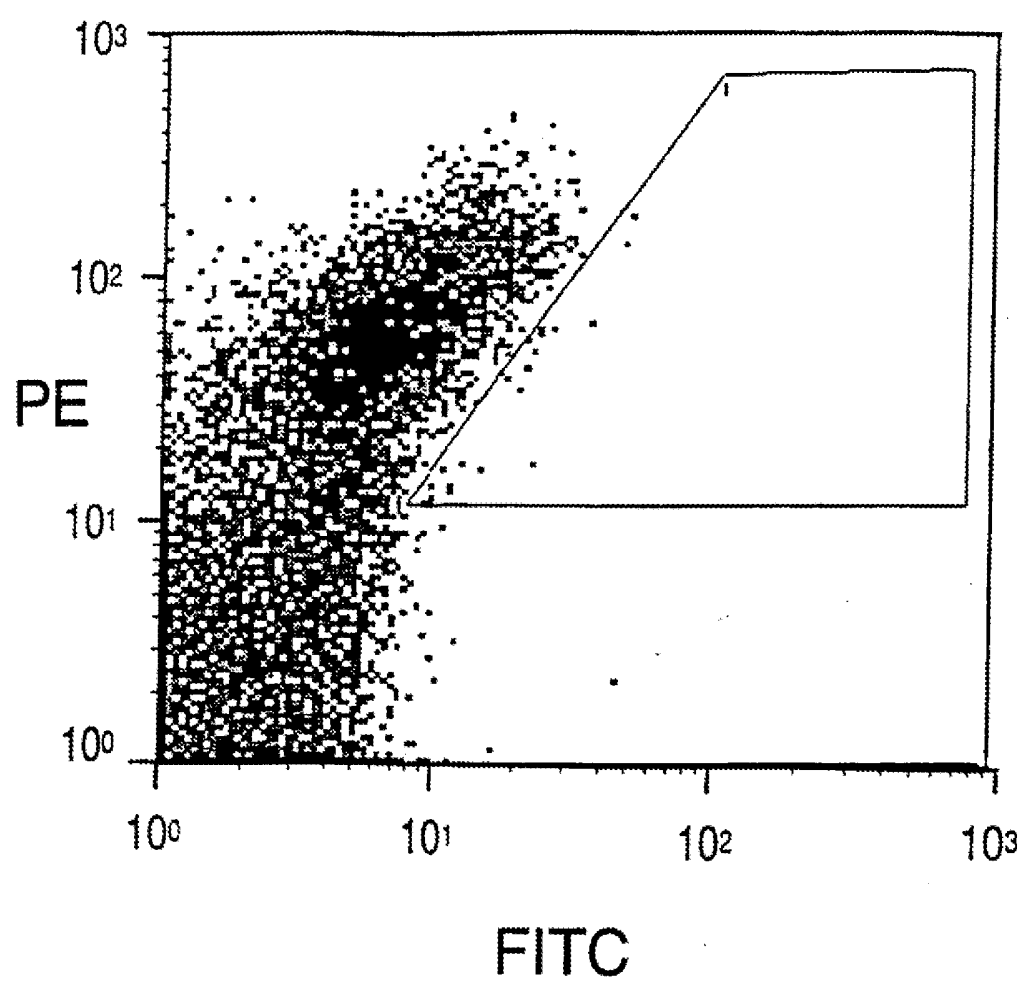


Figura 10A

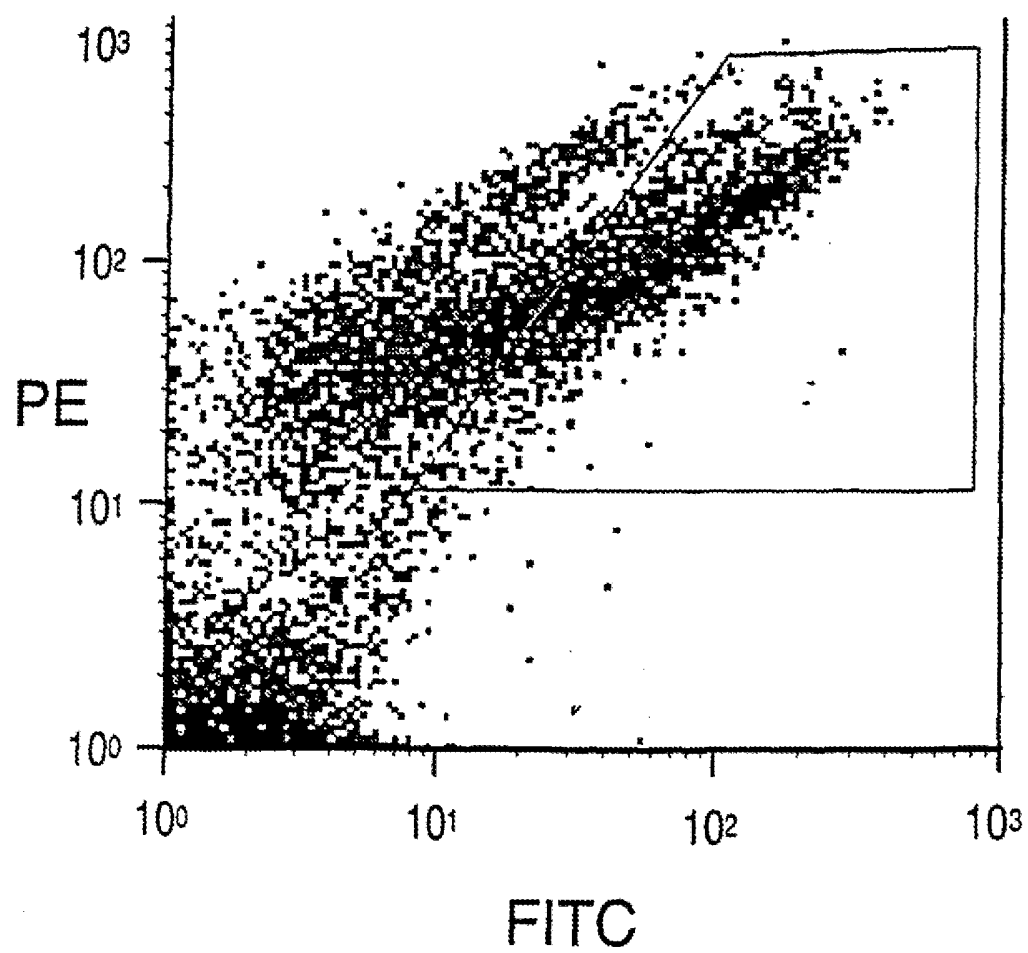


Figura 10B

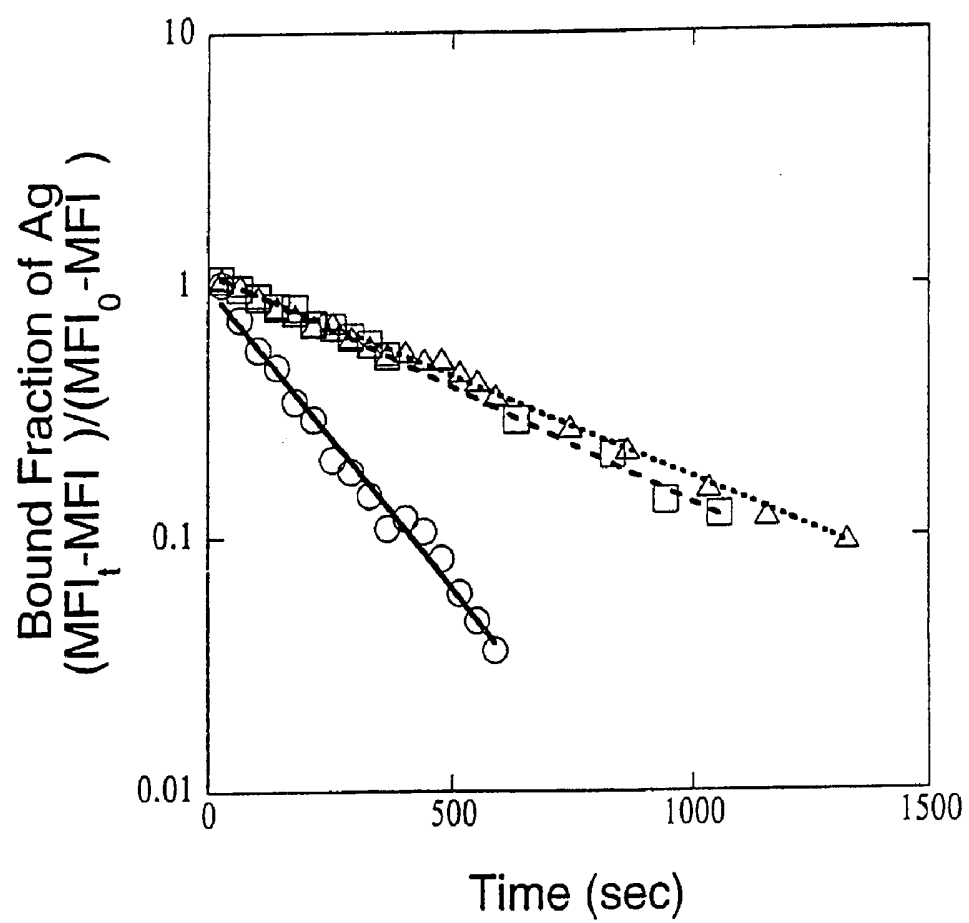


Figura 11

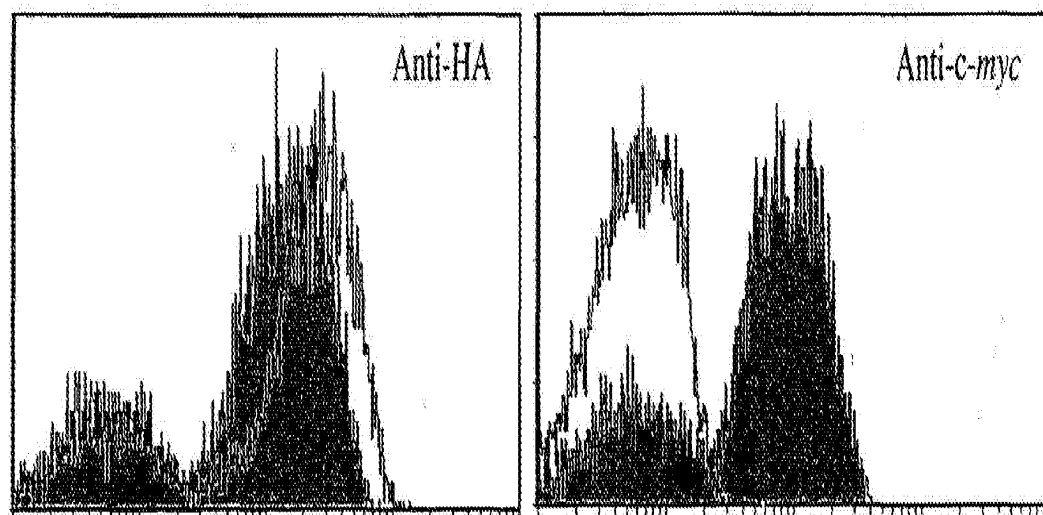


Figure 12A

Figure 12B

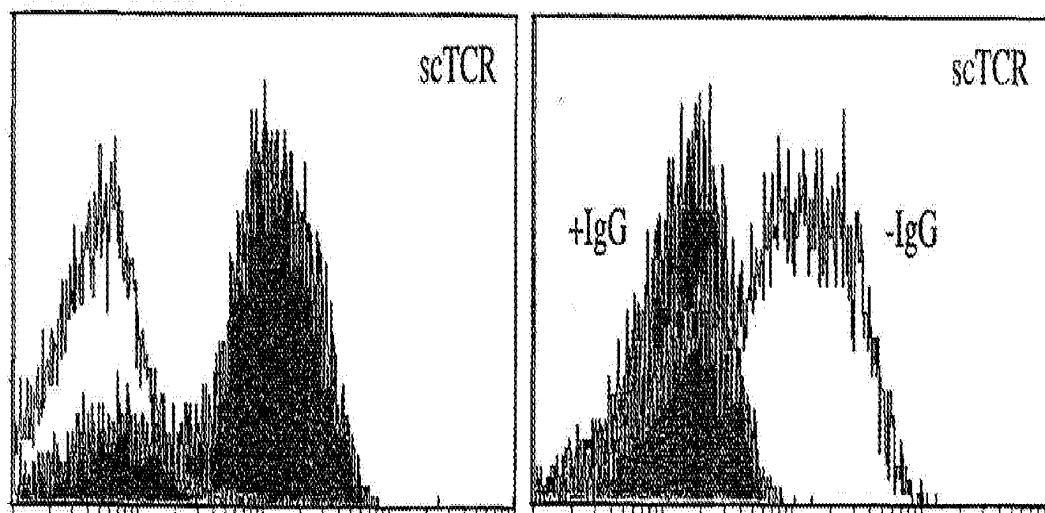


Figure 12C

Figure 12D

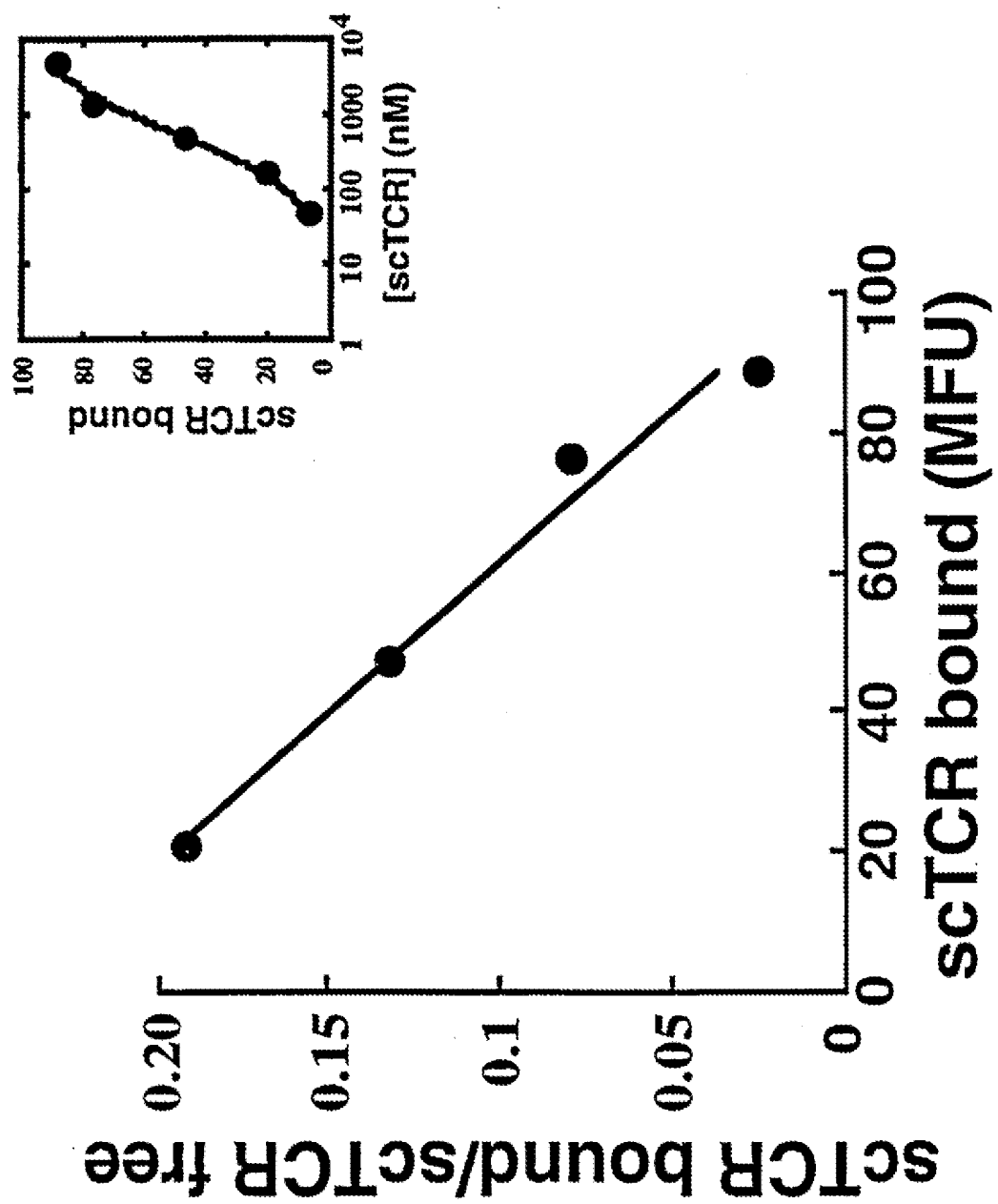


Figura 13

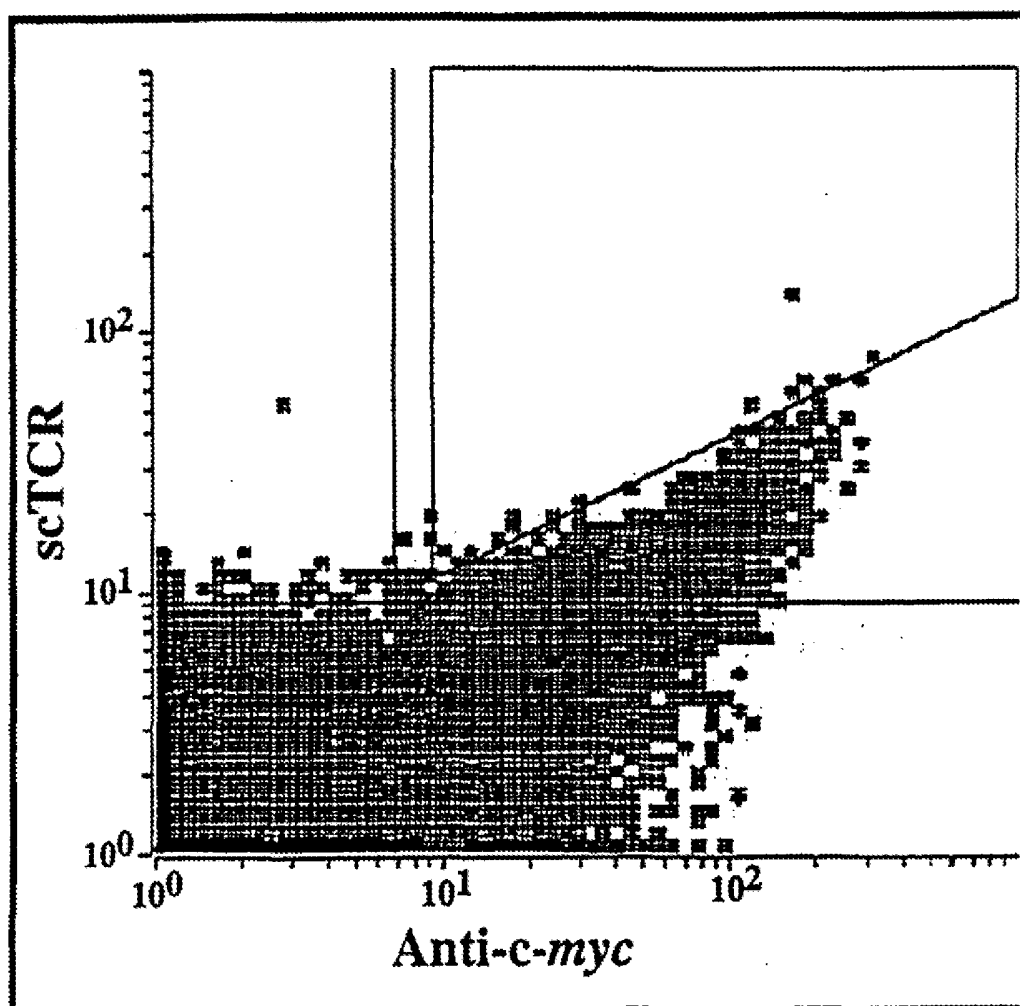


Figura 14A

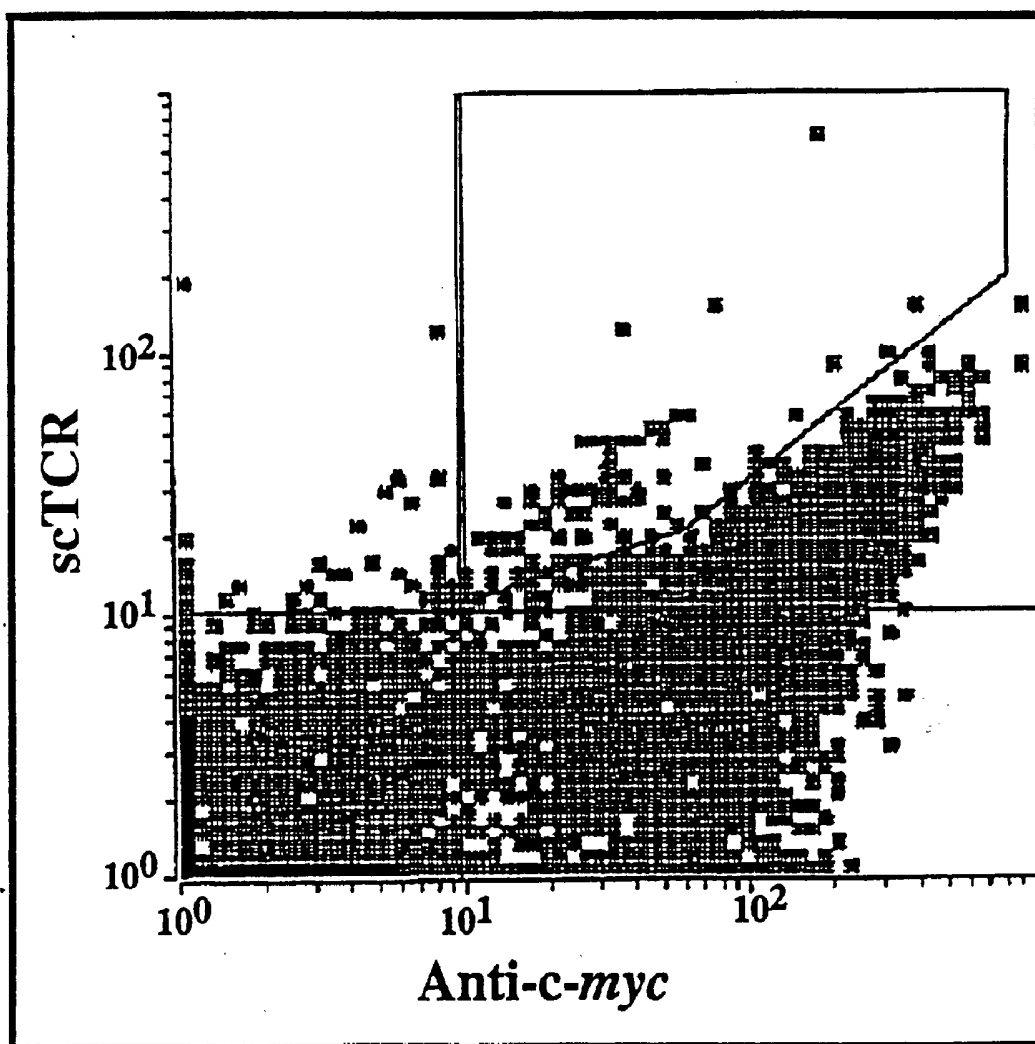


Figura 14B

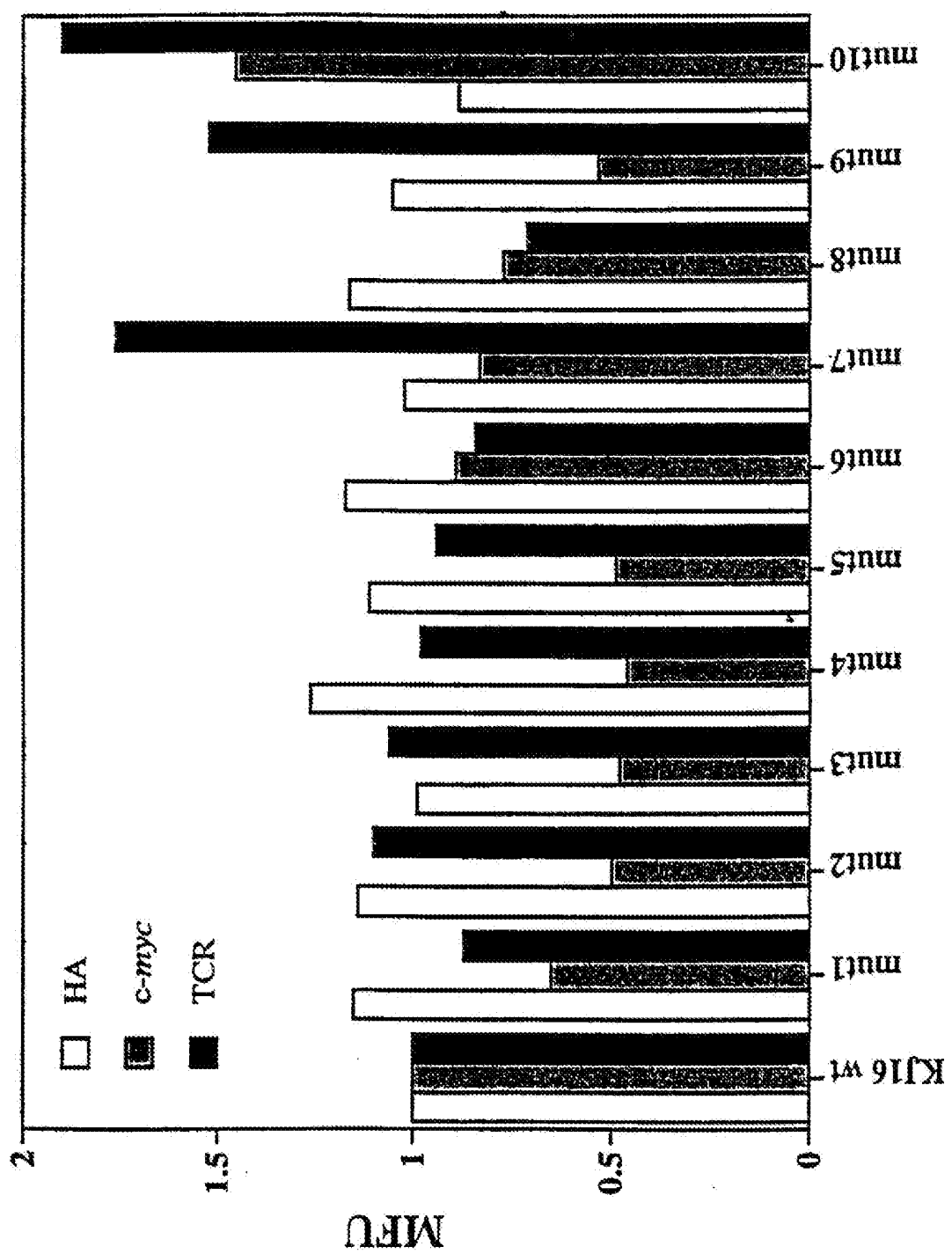
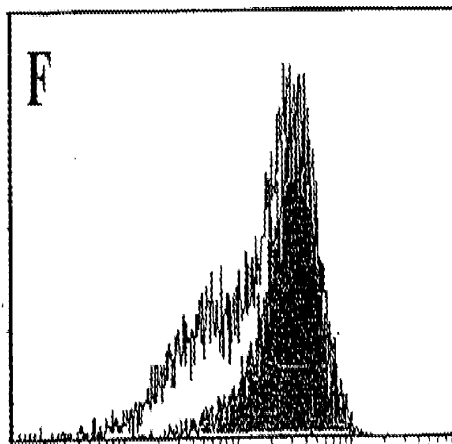
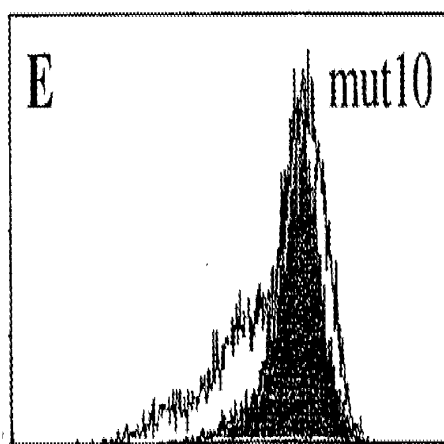
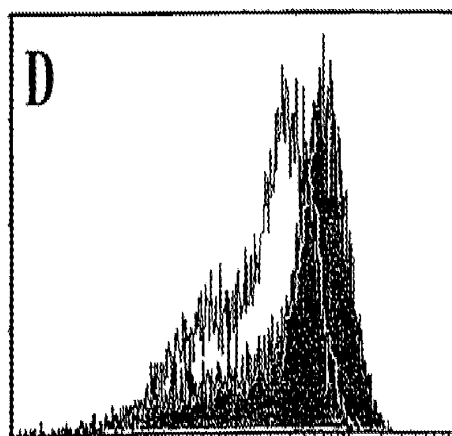
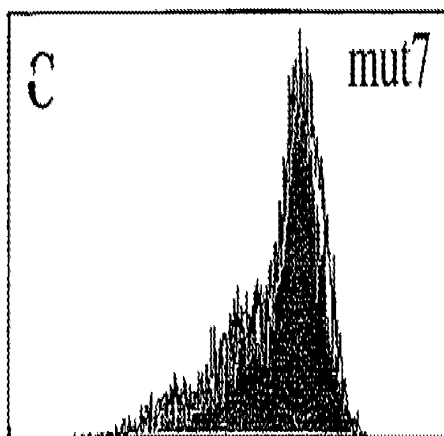
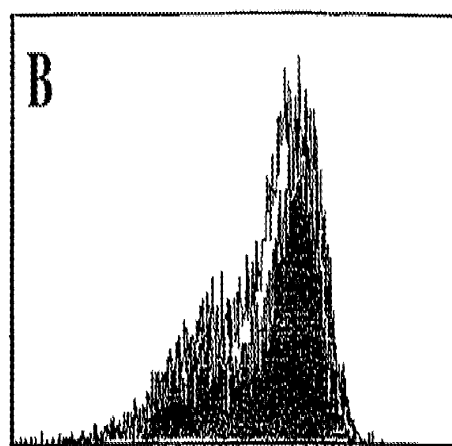
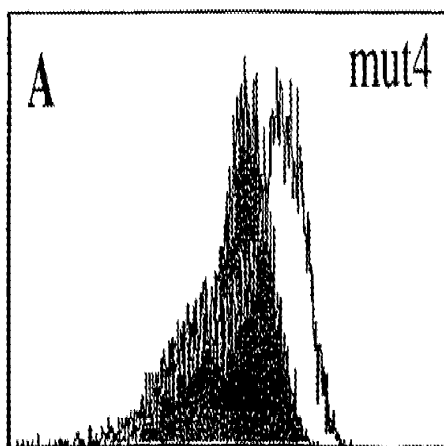


Figura 15

Anti-c-myc

scTCR



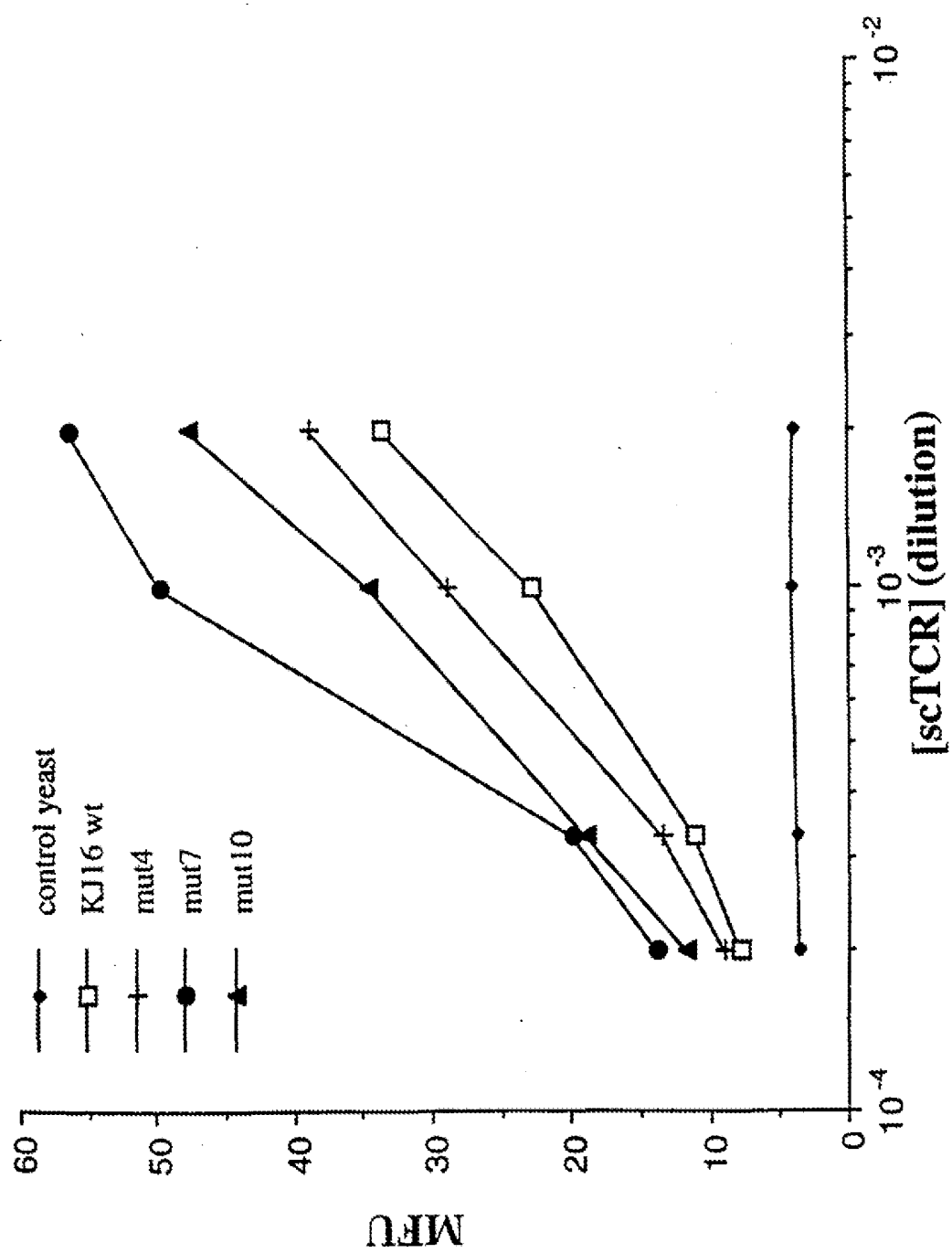


Figura 17

KJ16 wild-type	V_L	GACGTCCTGGTGACCCAAACTCCTGCCCTCCCTGTCTGCATCTCCGGATGAATC
KJ16 mut 4		GACGTCCTGGTGACCCAAACTCCTGCCCTCCCTGTCTGCATCTCCGGATGAATC
KJ16 mut 7		GACGTCCTGGTGACCCAAACTCCTGCCCTCCCTGTCTGCATCTCCGGATGAATC
-----CDR1-----		
KJ16 wild-type		TGTCACCATCACATGCCAGGCAAGCCAGGACATTTGGTACTTTGCTTAGTTTGGT
KJ16 mut 4		TGTCACCATCACATGCCAGGCAAGCCAGGACATTTGGTACTTTGCTTAGTTTGGT
KJ16 mut 7		TGTCACCATCACATGCCAGGCAAGCCAGGACATTTGGTACTTTGCTTAGTTTGGT
		↑ S26R
-----CDR2-----		
KJ16 wild-type		ATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAACTATC
KJ16 mut 4		ATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAACTATC
KJ16 mut 7		ATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAACTATC

KJ16 wild-type		TTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTAGATCTGGCACACAGTA
KJ16 mut 4		TTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTAGATCTGGCACACAGTA
KJ16 mut 7		TTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTAAATCTGGCACACAGTA
		↑ R66K

Figura 18-1

KJ16 wild-type	TTCTCTTAAGATCAACAGACTACAGGTGAAGATATTGGAACCTATTACTGTC
KJ16 mut 4	TTCTCTTAAGATCAACAGACTACAGGTGAAGATATTGGAACCTATTACTGTC
KJ16 mut 7	TTCTCTTAAGATCAACAGACTACAGGTGAAGATATTGGAACCTATTACTGTC

	-----CDR3-----
KJ16 wild-type	TACAGGTTTCTAGTTCTCCGTACACACGTTTGGAGCTGGCACCAAGCTGGAGCTC
KJ16 mut 4	TACAGGTTTCTAGTTCTCCGTACACACGTTTGGAGCTGGCACCAAGCTGGAGCTC
KJ16 mut 7	TACAGGTTTCTAGTTCTCCGTACACACGTTTGGAGCTGGCACCAAGCTGGAGCTC

✓
✓
✓

	V _H	-----C-myc-----
KJ16 wild-type	AAACGG.../..TCCTCAGAAACAAAGCTTATTTCGGAAGAAGATTTGTAGTAA	
KJ16 mut 4	AAACGG.../..TCCTCAGAAACAAAGAGCTTATTTCGGAAGAAGATTTGTAGTAA	
KJ16 mut 7	AAACGG.../..TCCTCAGAAACAAAGCTTATTTCGGAAGAAGATTTGTAGTAA	

↑

K258E

Figura 18-2

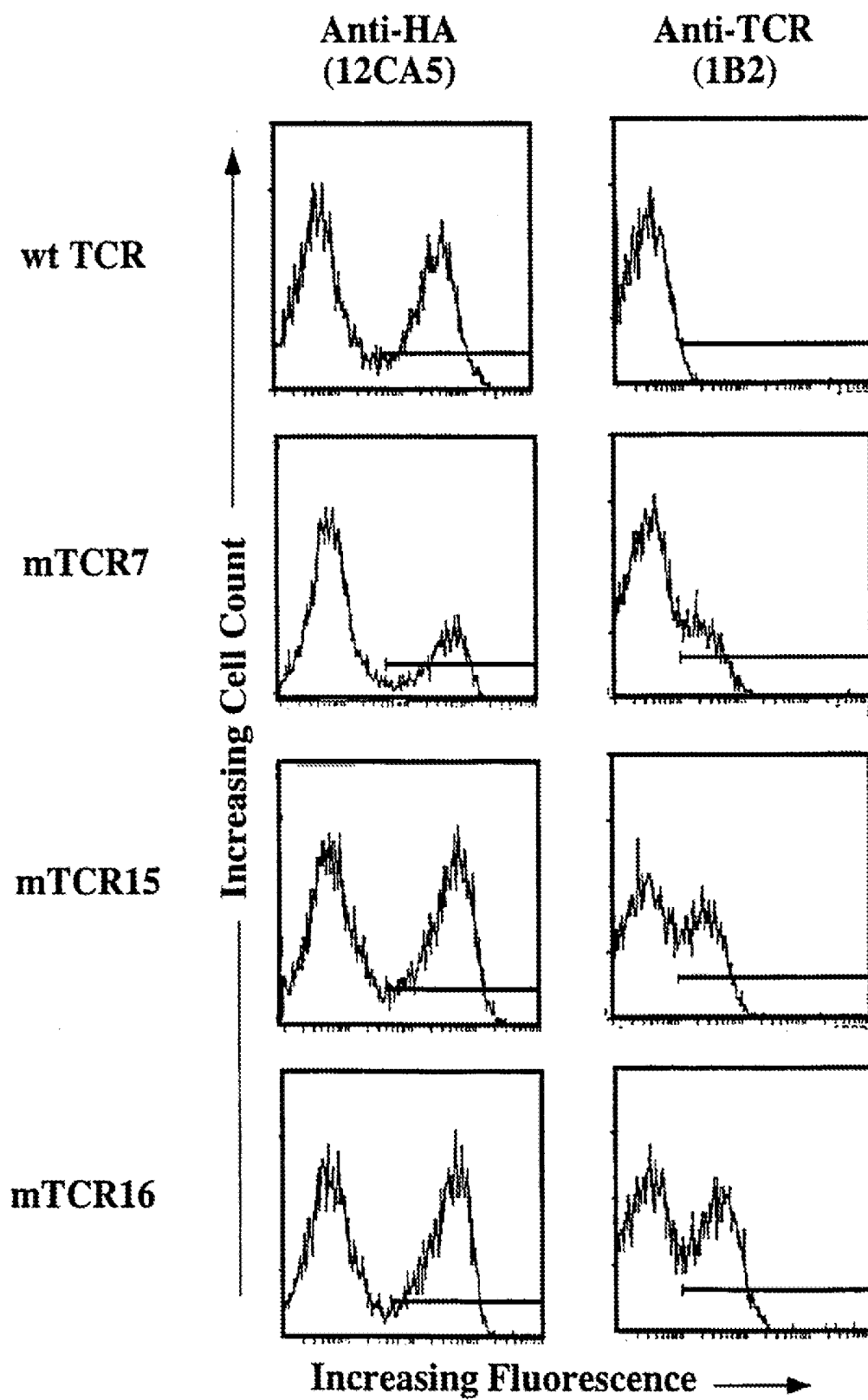


Figura 19

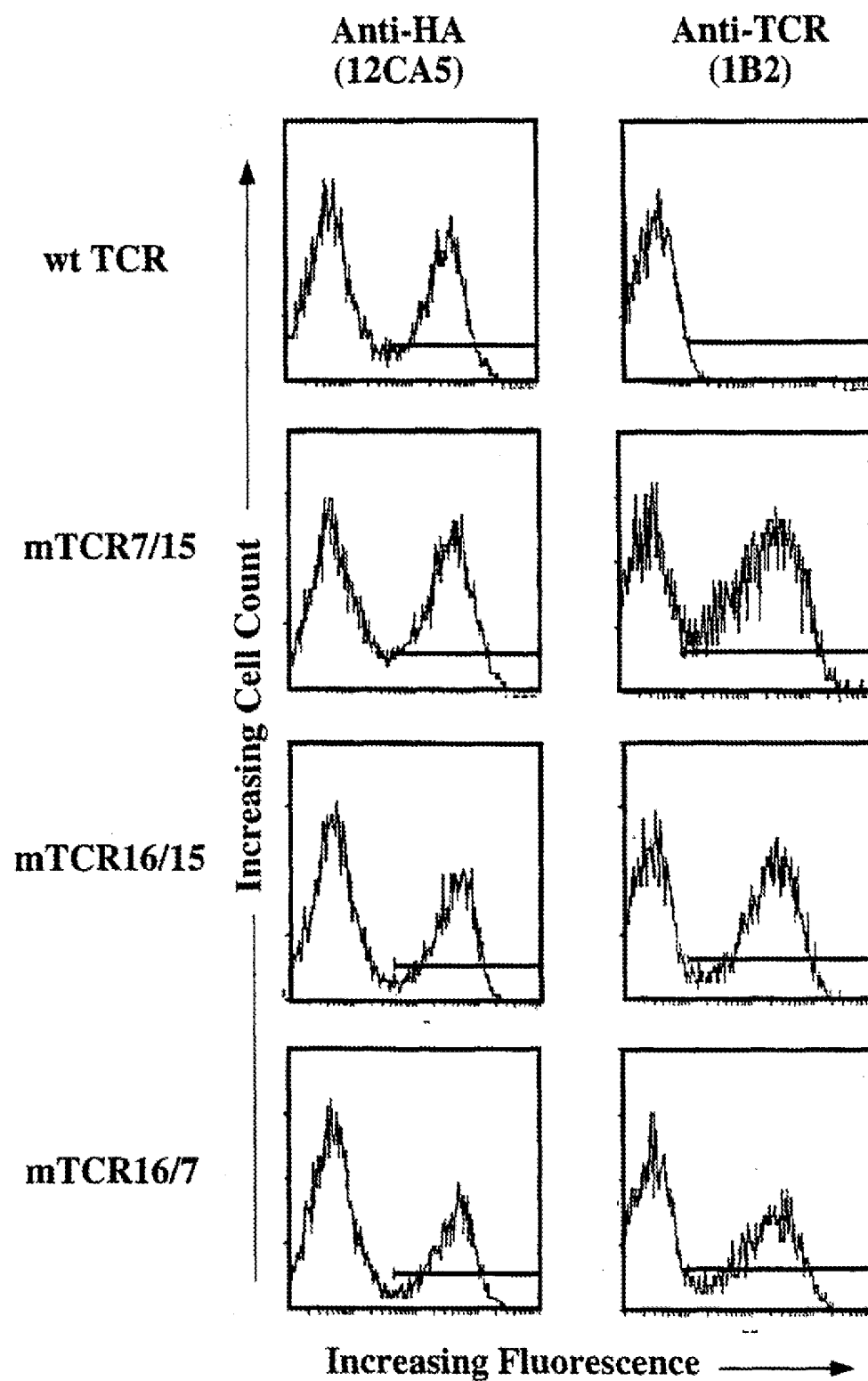


Figura 20

vβ8.2
 GACGTGCGCAG TCACCCCAAAG CCCAAGAAAC AAGGTGGCAG TAACAGGAGG **Gly17ΔGlu** AAAGGTGACA

 -----cdr1-----
 TTGAGCTGTA ATCAGACTAA TAACCACAAC AACATGTACT GGTATCGGCA GGACACGGGG

 -----cdr2-----
 CATGGGCTGA GGCTGATCCA TTATTCATAT GTGCTGGCA GCACTGAGAA AGGAGATATC

 -----hv4-----
 CCTGATGGAT ACAAGGCCTC CAGACCAAGC CAAGAGAACT TCTCCCTCAT TCTGGAGTTG

 -----cdr3-----
 GCTACCCCCCT CTCAGACATC AGTGTAATTC TGTGCCAGCG GTGGGGGGG CACCTTGATAC

linker
 TTTTGGTGCGG GCACCCGACT ATCGGTGCTA TCCTCCCGCG ATGATGCTAA GAAGGATGCT

vα3.1
 GCTAAGAAGG ATGATGCTAA GAAAGATGAT GCTAAGAAAG ATGCACAGTC AGTGACACAG

 CCCGATGCTC GCGTCACTGT CTCTGAAGGA GCCTCTCTGC AGCTGAGATG CAAGTATTCC

Figura 21-1

```

-----cdr1-----
TACTCTGCGA CACCTTATCT GTTCTGGTAT GTCCAGTACC CGCGGCAGGG GCTGCAGCTG
Leu43ΔPro

-----cdr2-----
CTCCTCAAGT ACTATTCCGG AGACCCAGTG GTTCAAGGAG TGAATGGCTT TGAGGCTGAG

-----hv4-----
TTCAGCAAGA GCAACTCTTC CTTCCACCCTG CGGAAAGCCT CCGTGCACCTG GAGCGACTCG

-----cdr3-----
GCTGTGTACT TCTGTGCTGT GAGCGGCTTT GCAAGTGCGC TGACATTTTG ATCTGGCACA
Leu104ΔPro

AAAGTCATTG TTCTACCATA CATCTAG + 6-His

```

Figura 21-2

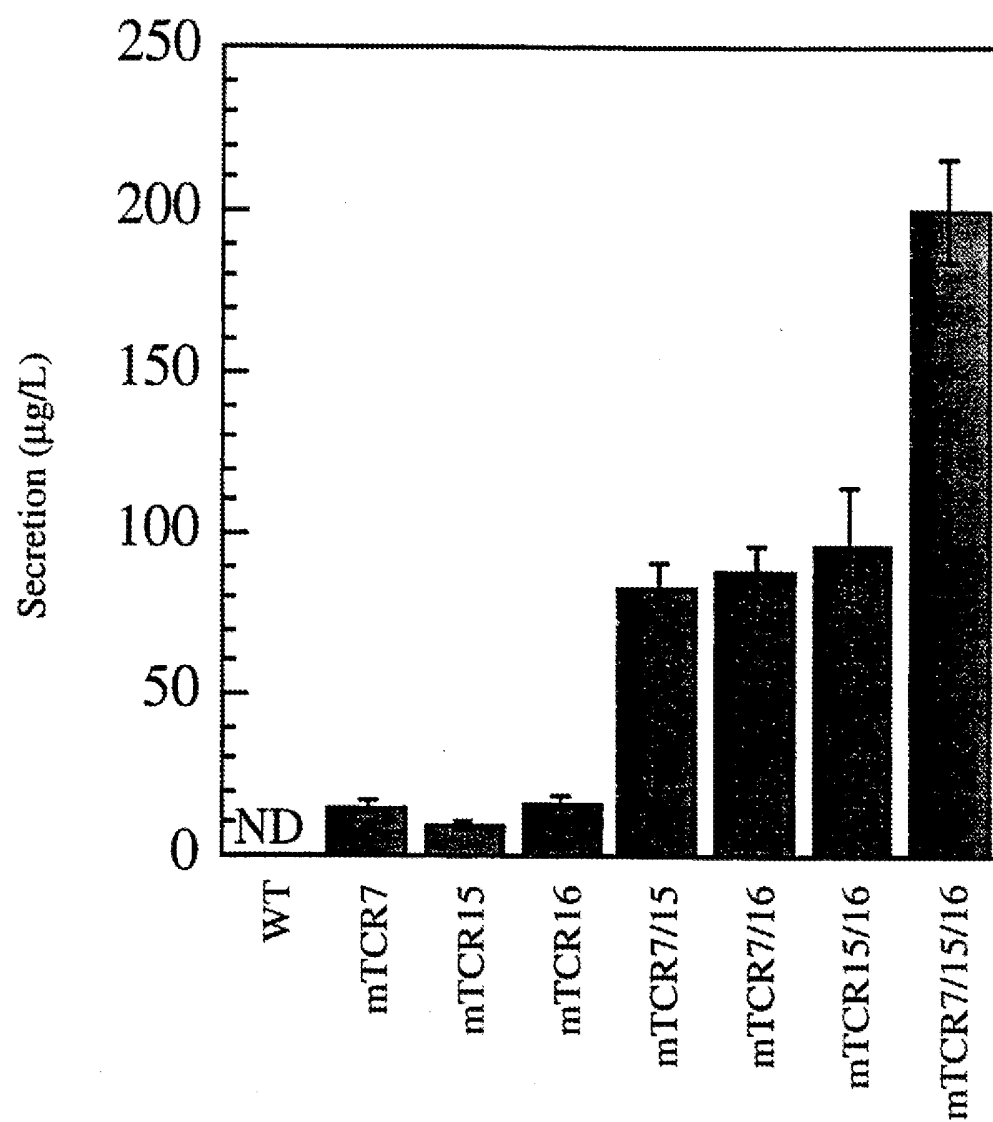


Figura 22

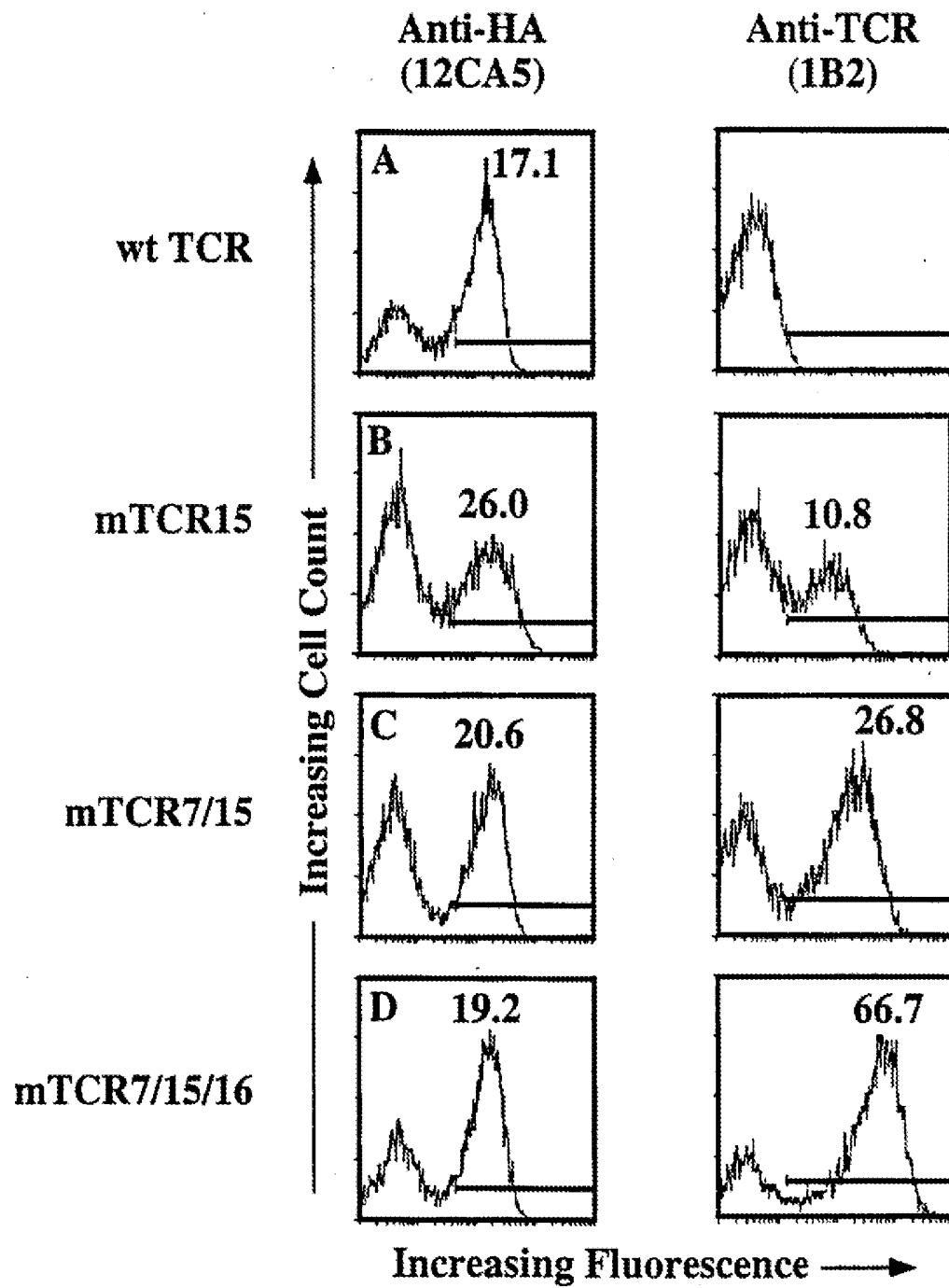


Figura 23A

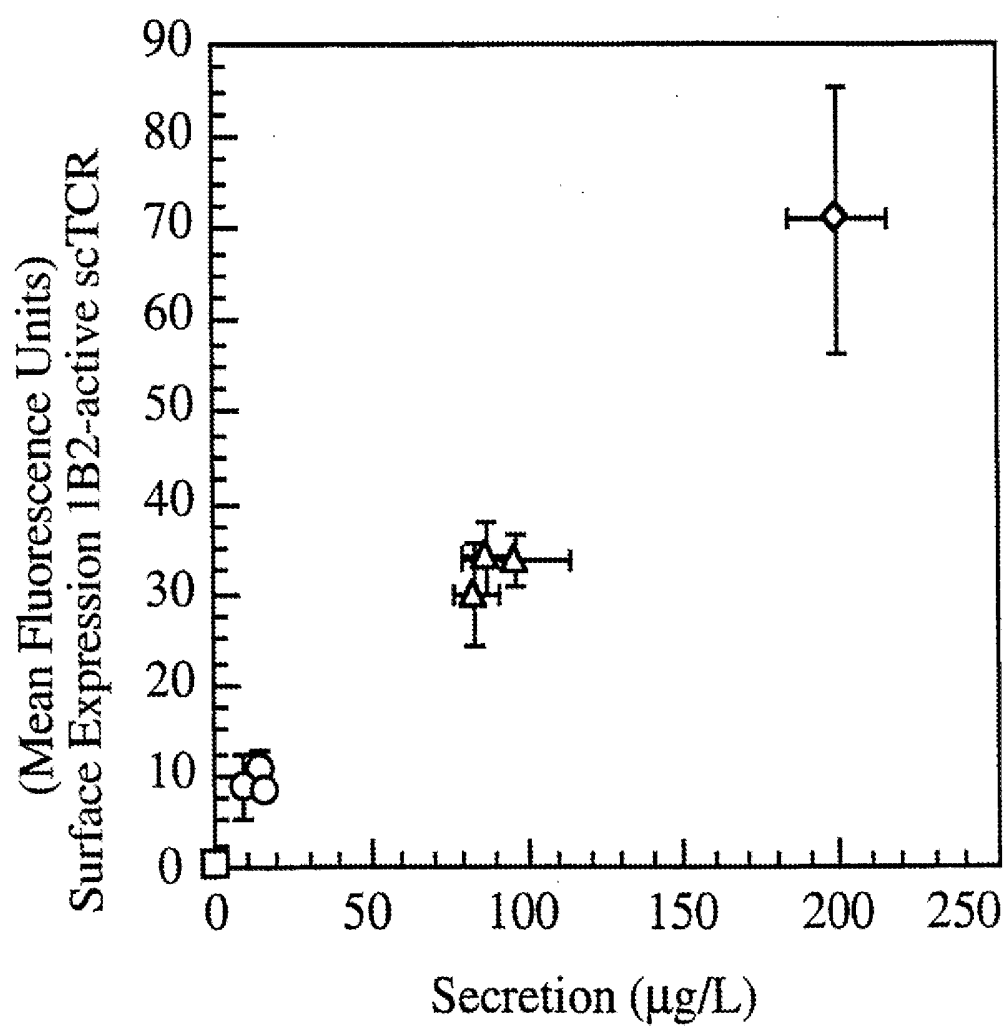


Figura 23B

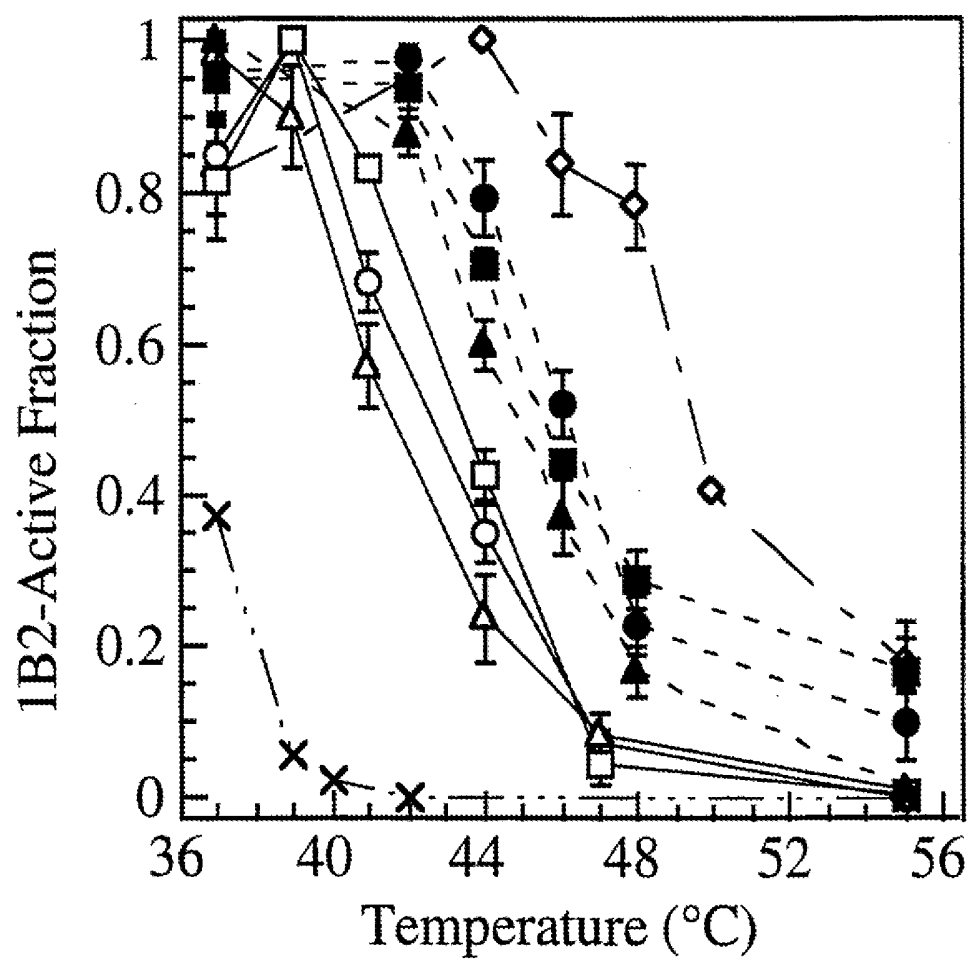


Figura 24A

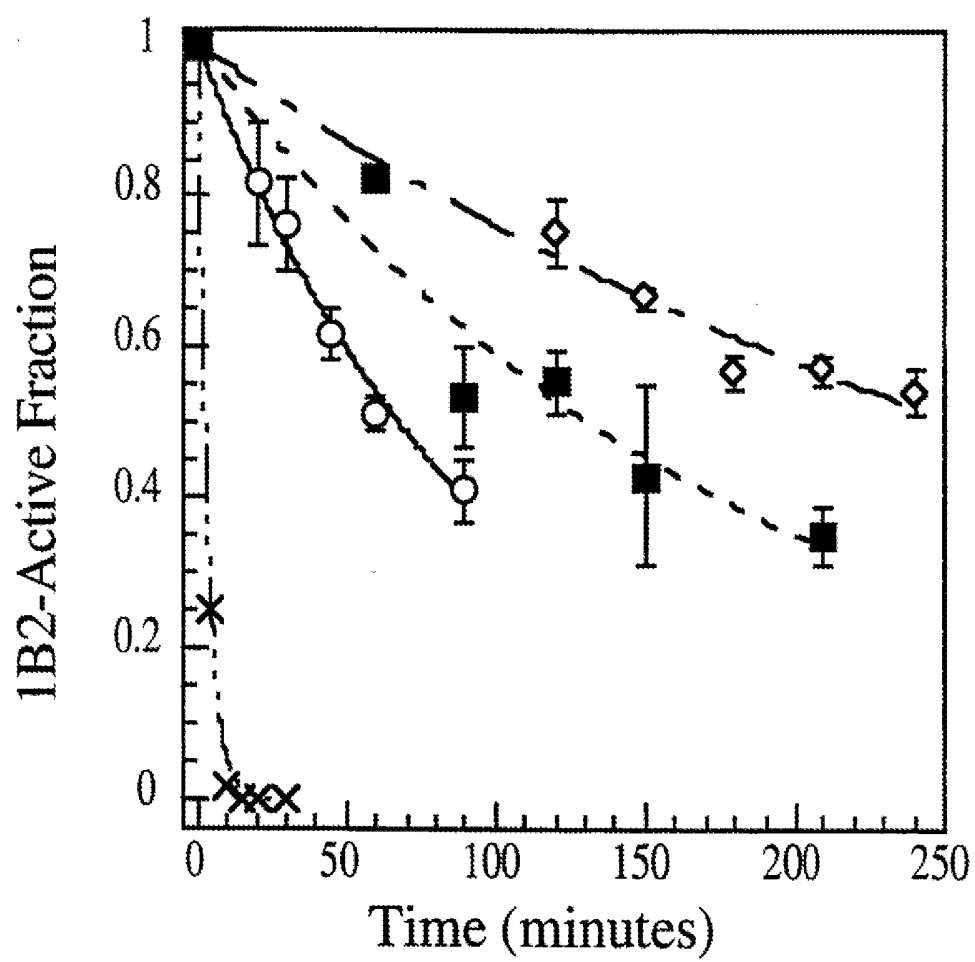


Figura 24B

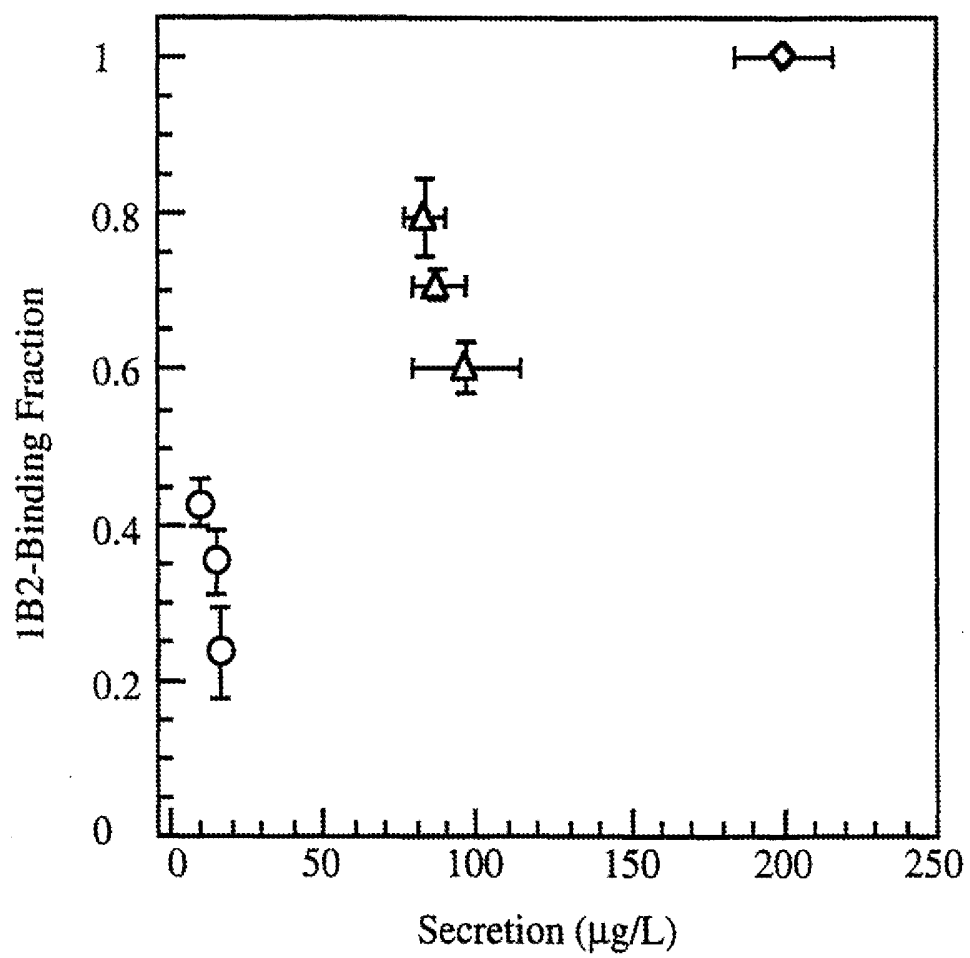


Figura 25