



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 327 905**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **02766425 .9**

⑨6 Fecha de presentación : **30.09.2002**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1438400**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

⑤4 Título: **Vectores de presentación eucariotas multi-cadena y usos de los mismos.**

③0 Prioridad: **01.10.2001 US 326320 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.11.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.11.2009

⑦3 Titular/es: **Dyax Corp.**
300 Technology Square, 8th Floor
Cambridge, Massachusetts 02139, US

⑦2 Inventor/es: **Hufton, Simon, E. y**
Hoogenboom, Hendricus, R., J., M.

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 327 905 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores de presentación eucariotas multi-cadena y usos de los mismos.

5 Antecedentes de la invención

El desarrollo de la tecnología de presentación en fagos, mediante la cual se expresan y anclan polipéptidos o proteínas no nativas (heterólogas) sobre la superficie ("presentación") de un bacteriófago, es una herramienta potente para la identificación de moléculas que poseen actividades biológicas de interés, por ejemplo, ligandos peptídicos que se unen con especificidad y/o afinidad alta con una molécula diana determinada. Es posible clonar en fase bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos en la secuencia codificante de genes que codifican una proteína de superficie de fago, por ejemplo, el gen III o el gen VIII del fago M13. Estos clones, cuando se expresan, se "presentan" sobre la superficie del fago en forma de una pluralidad, debido a la variación de las secuencias de los oligonucleótidos usados, de proteínas de fusión péptido-cápside. Estas bibliotecas de presentación de péptidos se exploran, entonces, para determinar la unión con moléculas diana, habitualmente por selección de afinidad o "bioselección" (Ladner, R. *et al.*, 1993; Kay *et al.*, 1996; Hoogenboom, H, *et al.*, 1997).

La exploración de bibliotecas de presentación de fagos presenta numerosas ventajas con respecto a otros métodos de exploración debido al elevado número de diferentes polipéptidos (típicamente, de más de 1×10^9) que pueden estar contenidos en una única biblioteca de presentación de fagos. Esto permite la exploración de una biblioteca altamente diversa en una sola etapa de exploración. La presentación en fagos de pequeños péptidos o proteínas de cadena única es conveniente mientras no se requiera o desee un procesamiento intracelular o una modificación post-traducciona (de lo que no son capaces los fagos o los huéspedes procariotas). Por ejemplo, la expresión eficaz de un polipéptido heterólogo puede requerir diversas modificaciones post-traducción, estructuras intracelulares y una serie de enzimas especializadas y proteínas chaperonas que son necesarias para transportar, glicosilar, adaptar, reunir y anclar adecuadamente el polipéptido de presentación sobre la superficie de la célula hospedadora; sin embargo, ninguno de estos procesos se puede conseguir mediante procesos de bacteriófagos o células procariotas.

Para la expresión de proteínas eucariotas más complejas, por ejemplo, polipéptidos multi-cadena incluyendo inmunoglobulinas y fragmentos funcionales de las mismas (por ejemplo, Fab), o de los dominios extracelulares de moléculas de MHC o moléculas receptoras de células T, es preciso superar problemas adicionales: expresión coordinada de las cadenas de componente a los niveles de expresión suficiente para producir productos multi-cadena, transporte y secreción de cada cadena, conservando al mismo tiempo la capacidad para lograr la asociación en un polipéptido multi-cadena funcional, e inmovilización (anclaje) de al menos una cadena del polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula hospedadora (es decir, para su expresión), mientras conserva la unión y funcionalidad apropiada fuera de la célula hospedadora del producto polipeptídico multi-cadena.

Se han presentado sistemas de presentación que utilizan células eucariotas, tales como levaduras, para expresar y presentar polipéptidos de cadena única (Boder, E. y Wittrup, K., 1998; Horwitz, A. *et al.*, 1988; Kieckhefer M. *et al.*, 1997; Kieckhefer, M. *et al.*, 1999; documentos WO 94/18330; WO 99/36569); sin embargo, existe la necesidad de sistemas eucariotas optimizados para la expresión y presentación funcional de polipéptidos multi-cadena, particularmente inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas. Además, existe en la técnica la necesidad de presentación de polipéptidos en un sistema que utilice el poder de la presentación en fagos y las ventajas de procesamiento de las células hospedadoras eucariotas. Por ejemplo, en contraste con las bibliotecas de presentación en fagos, el tamaño práctico máximo, o "diversidad", de una biblioteca que se puede expresar en la superficie de una célula hospedadora eucariota es de aproximadamente 10^6 a 10^7 .

Estos y otros problemas técnicos han obstaculizado el avance de las herramientas y técnicas biológicas útiles para identificar nuevas moléculas que poseen actividades biológicas interesantes. A causa de estos problemas técnicos, hasta la fecha no se han presentado materiales ni métodos para la construcción satisfactoria de un vector de presentación eucariota multi-cadena, de la presentación satisfactoria de un polipéptido multi-cadena (tal como un anticuerpo o un fragmento Fab) sobre la superficie de una célula hospedadora eucariota (tal como una levadura), de la creación de una biblioteca de presentación de polipéptidos multi-cadena en células hospedadoras eucariotas, ni del uso eficaz de estas bibliotecas para la detección y aislamiento de polipéptidos multi-cadena específicos de interés (por ejemplo, sobre la base de especificidad o afinidad de unión por una molécula diana).

Sumario de la invención

La invención que se describe en este documento resuelve estas y otras deficiencias de la técnica al proporcionar vectores de presentación mejorados, células que contienen bibliotecas de presentación y métodos para el uso de estas bibliotecas y vectores. De forma específica, la presente invención proporciona un vector de presentación eucariota capaz de presentar un polipéptido multi-cadena en la superficie de una célula hospedadora, de manera que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula hospedadora. Un vector de este tipo permite la expresión de polipéptidos biológicamente activos más complejos, por ejemplo, polipéptidos multi-cadena biológicamente activos, que la que se puede obtener a través de la tecnología de presentación en fagos convencional.

La presente invención se refiere a la presentación y aislamiento de polipéptidos biológicamente activos. Específicamente, la presente invención se refiere al diseño y uso de nuevos vectores de presentación multi-cadena.

La presente invención describe y hace posible la presentación satisfactoria de un polipéptido multi-cadena en la superficie de una célula hospedadora eucariota. Se describen vectores preferidos para expresar las cadenas de un polipéptido multi-cadena en una célula hospedadora por separado e independientemente (por ejemplo, bajo elementos separados de control de vectores y/o en vectores de presentación separados, formando de este modo un conjunto de vectores correspondiente). El uso de estos conjuntos de vectores correspondientes proporciona un nivel de flexibilidad y versatilidad en la generación de bibliotecas de presentación, por ejemplo, la capacidad para generar y expresar polipéptidos multi-cadena mediante vectores combinados y recombinantes que expresan una diversidad de las cadenas individuales de un polipéptido multi-cadena. Es posible diseñar repertorios completos de nuevas combinaciones de cadenas con el uso de estos conjuntos de vectores.

Adicionalmente, la invención proporciona la capacidad de combinar la tecnología de presentación en fagos (con su facilidad de manipulación y su magnitud de diversidad) con la complejidad y versatilidad potenciales de un vector (o conjunto de vectores) de presentación eucariota multi-cadena. Los métodos particulares descritos en este documento permiten a un facultativo transferir eficazmente información sobre secuencias de una biblioteca de péptidos (o miembros seleccionados de la biblioteca) entre sistemas de presentación en fagos y de presentación en eucariotas, lo que se logra a través de la transferencia física de la información de secuencia desde un vector de presentación a otro (usando técnicas de ingeniería genética convencionales), o a través del uso de un nuevo vector de presentación dual, que se puede utilizar en sistemas tanto de presentación eucariota como de presentación en fagos (que necesariamente implica la expresión procariota).

La presente invención se refiere a un vector nuevo, de utilidad en una célula hospedadora eucariota para expresar un polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula eucariota, de manera que en la superficie de la célula hospedadora se muestra una actividad biológica del polipéptido multi-cadena, por ejemplo, la actividad de unión de un polipéptido multi-cadena. Aunque una realización preferida del vector de la presente invención es la de un único paquete genético replicable, el vector de presentación eucariota multi-cadena puede existir como un vector único o como múltiples vectores independientes de un conjunto de vectores. Tal como se usa en este documento, "vector" se refiere a una única molécula de vector o a un conjunto de vectores. En una realización, el vector de presentación es un vector lanzadera o, más exactamente, un vector de presentación dual, donde el vector es capaz de presentar un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota transformada con ese vector, o en la superficie de un bacteriófago generado como consecuencia de la expresión procariota. En otro aspecto de la invención, el vector puede existir como un conjunto de vectores, en el que cada cadena de un polipéptido multi-cadena está codificada en uno de los vectores de un par correspondiente, de modo que cuando el par de vectores está presente en una única célula eucariota, se asocian las cadenas del polipéptido multi-cadena y en la superficie de la célula eucariota se muestra la actividad biológica del polipéptido multi-cadena.

El vector de presentación multi-cadena eucariota de la presente invención comprende polinucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas del polipéptido multi-cadena. Un primer polinucleótido codifica una primera cadena del polipéptido multi-cadena unido a una proteína de anclaje. Otros polinucleótidos del vector (o conjunto de vectores) codifican otras cadenas del polipéptido multi-cadena. Todos los polinucleótidos del o de los vectores de presentación se encuentran situados operativamente en el vector de presentación, de manera que una célula eucariota, transformada con el vector (o conjunto de vectores), presenta el polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula eucariota y, de esta forma, en la superficie de la célula se muestra la actividad biológica del polipéptido multi-cadena.

Preferiblemente, el polipéptido multi-cadena codificado por el vector o los vectores de presentación multi-cadena de la presente invención existe en forma de un polipéptido bi, tri, tetra o multi-cadena. Más preferiblemente, el polipéptido multi-cadena es un polipéptido bicatenario o tetracatenario compuesto por dos cadenas diferentes. Más preferiblemente, el polipéptido multi-cadena se selecciona de un grupo de polipéptidos multi-cadena que consiste en receptores de células T, moléculas de MHC de clase I, moléculas de MHC de clase II y fragmentos Fab de inmunoglobulina. Más preferiblemente, el polipéptido multi-cadena es una IgA, IgD, IgE, IgG, IgM o un fragmento biológicamente activo de las mismas. Más preferiblemente, el polipéptido multi-cadena es un fragmento Fab, en el que el primer polinucleótido del vector de presentación multi-cadena comprende un segmento que codifica los dominios V_H y C_H1 de una cadena pesada de Ig y un segundo polinucleótido comprende un segmento que codifica una cadena ligera de Ig (dominios V_L y C_L).

De acuerdo con la presente invención, un primer polinucleótido que codifica una primera cadena del polipéptido multi-cadena está unido a una proteína de anclaje. Preferiblemente, la proteína de anclaje es una proteína de la superficie celular de una célula eucariota o un fragmento funcional de la misma. Más preferiblemente, la proteína de anclaje es α -aglutinina, Aga1p, Aga2p o FLO1. Tal como se describe en este documento, la unión de la primera cadena de polipéptido con una proteína de anclaje se puede conseguir por medio de una diversidad de técnicas de biología molecular. Preferiblemente, el primer polinucleótido que codifica una primera cadena del polipéptido multi-cadena se expresa en una célula hospedadora eucariota como una proteína de fusión de primera cadena-anclaje; más preferiblemente, una proteína de fusión de primera cadena:Aga2p.

En una realización, una o más de las cadenas del polipéptido multi-cadena expresadas por el vector o los vectores en una célula hospedadora está unida a un gen informador o marcador. Preferiblemente, el marcador es un marcador de epítipo seleccionado del grupo que consiste en marcador 6xHis, marcador HA y marcador myc. Más preferiblemente, cada cadena del polipéptido multi-cadena está unida a un marcador diferente.

Preferiblemente, el vector o los vectores de presentación multi-cadena de la presente invención proporcionan sitios de clonación para facilitar la transferencia de la secuencia o las secuencias de polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multi-cadena. Estos sitios de clonación comprenden un sitio de reconocimiento de una endonucleasa de restricción (es decir, sitios de restricción) situados para facilitar la escisión e inserción de polinucleótidos que codifican una o más cadenas de un polipéptido multi-cadena. Por ejemplo, los sitios de restricción están localizados, preferiblemente, en los extremos 5' y 3' del polinucleótido o de los polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multi-cadena. El vector de la presente invención puede contener solamente dos sitios de restricción posicionados en los extremos del segmento polinucleotídico que incluye todos los segmentos que codifican las cadenas del polipéptido multi-cadena o, preferiblemente, los sitios de restricción se presentan en los extremos de cada segmento polinucleotídico que codifica una cadena del polipéptido multi-cadena (Figs. 1 y 2). Preferiblemente, cada sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción es un sitio de reconocimiento único en el vector.

El vector (o conjunto de vectores) de la presente invención es funcional en una diversidad de células hospedadoras eucariotas y, opcionalmente, es funcional también en células procariotas (por ejemplo, bacterias). Preferiblemente, el vector de presentación multi-cadena de la presente invención es un vector de presentación en células animales, un vector de presentación en células de planta, un vector de presentación en células fúngicas o un vector de presentación en una célula protista. Más preferiblemente, el vector de presentación es un vector de presentación en levadura. Más preferiblemente, el vector de presentación en levadura actúa en *Saccharomyces cerevisiae*.

En otra realización, la invención se refiere a un método para usar el vector (o conjunto de vectores) descrito y mostrado en este documento para presentar un polipéptido multi-cadena en la superficie de una célula hospedadora eucariota, en el que el vector (o conjunto de vectores) se introduce en la célula eucariota y la célula hospedadora se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión, transporte y asociación de las cadenas del polipéptido multi-cadena, de modo que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula hospedadora. Como se describe en este documento, los polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multi-cadena se pueden introducir en la célula hospedadora a través de uno o múltiples vectores. La forma de introducir el vector o los vectores en la célula hospedadora incluye cualquiera de los métodos destinados a la introducción de material genético en una célula conocidos en la técnica. Las formas preferidas incluyen las técnicas de transformación conocidas en la técnica que incluyen, pero sin limitación, electroporación, microinyección, transferencia viral, inserción balística y similares.

Otra forma preferida de introducir vectores de presentación eucariotas multi-cadena en una célula hospedadora incluye la fusión de dos células eucariotas haploides, cada una de las cuales expresa al menos una de las cadenas del polipéptido multi-cadena, para producir una célula hospedadora diploide que expresa ambas (todas) cadenas, de manera que en la superficie de la célula hospedadora diploide resultante se muestra la actividad biológica del polipéptido multi-cadena. Por ejemplo, cada una de las dos células haploides puede contener uno (o más) de los vectores de un conjunto de vectores (tal como se describe en este documento), de forma que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula hospedadora diploide que se produce a partir de la fusión haploide/haploide. Preferiblemente, el par de células hospedadoras haploides son de tipos de apareamiento opuesto, facilitando de este modo la fusión ("apareamiento") de las dos células haploides eucariotas.

Otro objeto de la invención se refiere a una célula hospedadora eucariota que muestra en la superficie celular la actividad biológica de un polipéptido multi-cadena. Como se describe en este documento, la célula hospedadora eucariota es preferiblemente una célula animal, una célula vegetal, una célula fúngica o una célula protista. Más preferiblemente, la célula hospedadora eucariota es una célula de levadura. Preferiblemente, la célula hospedadora de levadura se selecciona de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*. Más preferiblemente, la célula hospedadora eucariota es *S. cerevisiae*. Las células hospedadoras eucariotas de la presente invención pueden ser de cualquier construcción genética, pero preferiblemente son haploides o diploides.

Una realización de la presente invención se refiere a un par de células haploides eucariotas (preferiblemente, de tipos de apareamiento opuestos), en el que la primera célula haploide expresa al menos un primer polinucleótido que codifica una primera cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a una proteína de anclaje, y la segunda célula haploide expresa al menos un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multi-cadena. Como se ha analizado anteriormente, la fusión de este par de células haploides da como resultado una célula diploide que muestra la actividad biológica del polipéptido multi-cadena en la superficie celular. La presente invención se refiere adicionalmente a colecciones de las diversas realizaciones descritas en este documento, que forman bibliotecas nuevas de polipéptidos multi-cadena o de los polinucleótidos que los codifican. Las bibliotecas de la presente invención comprenden una pluralidad de vectores que codifican un polipéptido multi-cadena, de manera que el vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de las cadenas del polipéptido multi-cadena, la asociación de las cadenas de forma que se constituya la actividad biológica del polipéptido multi-cadena y el anclaje de al menos una cadena del polipéptido multi-cadena, de manera que la actividad biológica

del polipéptido multi-cadena se muestre en la superficie de la célula hospedadora eucariota. Preferiblemente, la biblioteca de la presente invención está comprendida de miembros de la biblioteca que codifican una multiplicidad de diferentes polipéptidos multi-cadena. Más preferiblemente, la biblioteca está formada por miembros de la biblioteca que codifican una multiplicidad de polipéptidos multi-cadena variantes (diseñados y producidos por la variegación de un molde de polipéptidos multi-cadena). Las colecciones de nuevas bibliotecas multi-cadena de la presente invención incluyen bibliotecas de vectores, bibliotecas de células hospedadoras y bibliotecas de pares de células hospedadoras, como se describe y muestra en este documento.

Un aspecto relacionado de la presente invención se refiere a un método para transferir información de secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido multi-cadena biológicamente activo entre un vector de presentación en fago y un vector de presentación eucariota. Un método de transferencia comprende insertar secuencias de polinucleótidos, que codifican las cadenas de un polipéptido multi-cadena, obtenidas a partir de un vector de presentación en fago en un vector de presentación multi-cadena eucariota, tal como se describe y muestra en este documento. La transferencia de la información de secuencia de ácido nucleico que codifica las cadenas de un polipéptido multi-cadena puede producirse como un acontecimiento de transferencia aislado, o puede tener lugar como acontecimientos de transferencia separados e independientes de la información de secuencia de ácido nucleico que codifica cada una de las cadenas del polipéptido multi-cadena. De manera similar, la información de la secuencia que codifica cada una de las cadenas de un polipéptido multi-cadena se puede transferir a partir de un vector de presentación en fago o a partir de múltiples vectores de presentación diferentes.

Otro método para transferir la información de secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido multi-cadena biológicamente activo entre un vector de presentación en fago y un vector de presentación eucariota (e inverso al que se acaba de describir) comprende la inserción de secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas de un polipéptido multi-cadena, obtenidas de un vector de presentación multi-cadena eucariota, tal como se ha descrito y mostrado en este documento, en un vector de presentación en fago. El proceso de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota de la presente invención es bidireccional, es decir, puede producirse desde el vector de presentación en fago al vector de presentación eucariota o desde el vector de presentación eucariota al vector de presentación en fago.

La transferencia de información de la secuencia de ácido nucleico entre un vector de presentación en fago y el vector eucariota de la presente invención se puede lograr por medio de una diversidad de métodos de transferencia genética conocidos en la técnica (por ejemplo, tecnología de ingeniería genética tal como tecnología de ADN recombinante). Las formas preferidas de transferencia incluyen técnicas de digestión de restricción, amplificación por PCR o recombinación homóloga (por ejemplo, véase Liu, Q. *et al.*, 2000; Walhout, A. *et al.*, 2000).

La presente invención se dirige también a métodos para detectar y aislar polipéptidos multi-cadena que muestran una actividad biológica de interés para el facultativo. Los métodos de la presente invención permiten la detección de interacciones deseables entre polipéptidos multi-cadena y otras especies moleculares, preferiblemente, interacciones proteína-proteína y, más preferiblemente, interacciones entre polipéptidos multi-cadena y sus ligandos/sustratos (es decir, moléculas diana). Preferiblemente, la naturaleza de esta interacción comprende una asociación (es decir, unión) no covalente entre las especies moleculares, si bien la naturaleza de la unión puede ser transitoria (por ejemplo, unión enzima-sustrato) o de alta afinidad/avidez (por ejemplo, como ocurre con ligandos de afinidad útiles en separaciones, diagnósticos y/o tratamientos).

En una realización, el método de la presente invención es útil para explorar una biblioteca de polipéptidos multi-cadena (expresados en la superficie de una célula hospedadora eucariota), mediante la detección de los miembros de la biblioteca que muestran una actividad biológica de interés para el facultativo. En una realización particularmente preferida, se aíslan las células hospedadoras que expresan los polipéptidos multi-cadena que muestran la actividad biológica de interés; a continuación, las células hospedadoras aisladas se someten opcionalmente a rondas repetidas de exploración o de otra forma se manipulan, para caracterizar o utilizar la secuencia polipeptídica del polipéptido multi-cadena presentado. Además, el método de exploración de la presente invención se puede combinar con una exploración (preliminar) de presentación en fago y transferencia de los aislados seccionados de presentación en fago al sistema de presentación eucariota descrito en este documento para la exploración de presentación eucariota.

En una realización adicional de la presente invención, es posible explorar una biblioteca de polipéptidos multi-cadena expresados en la superficie de una célula hospedadora diploide eucariota, donde la célula diploide contiene un conjunto de vectores multi-cadena como se ha descrito y mostrado en este documento, para detectar (y, opcionalmente, aislar) polipéptidos multi-cadena que muestren una actividad biológica de interés para el facultativo. Preferiblemente, la célula hospedadora diploide eucariota es el producto de la fusión de un par de células hospedadoras haploides eucariotas, como se ha descrito y mostrado en este documento. En una realización particularmente preferida, se pueden aislar las células diploides detectadas que presenten un polipéptido multi-cadena que muestre una actividad biológica de interés y, a continuación, opcionalmente, se pueden someter a meiosis, mediante la cual las células hijas (haploides) expresan cadenas separadas del polipéptido multi-cadena seleccionado. Después, las células hijas se pueden fusionar con otras células haploides que expresen cadenas de un polipéptido multi-cadena (por ejemplo, otras células hijas de la misma sub-población de células diploides aisladas), dando lugar a una población recombinante de células hospedadoras diploides eucariotas que presentan en su superficie un polipéptido multi-cadena. Se pueden llevar a cabo rondas adicionales de exploración y recombinación repetida de las cadenas individuales del polipéptido multi-cadena

seleccionado y, en última instancia, la secuencia polipeptídica del polipéptido multi-cadena presentado se puede caracterizar o utilizar como se ha descrito anteriormente. La recombinación de las células hijas haploides seleccionadas también se puede recombinar (por fusión celular) con otros vectores de presentación Eucariotas, modificados o no, para producir nuevas bibliotecas de presentación multi-cadena.

El vector de presentación eucariota se puede utilizar para crear una biblioteca de presentación eucariota, tal como una biblioteca de presentación en levadura, que comprende una pluralidad de tales vectores de presentación eucariotas. Preferiblemente, una pluralidad de vectores de presentación eucariotas codificará una población heterogénea de polipéptidos multi-cadena, dando lugar a la expresión de un repertorio de polipéptidos multi-cadena, por ejemplo, al menos 10^4 , preferiblemente al menos 10^5 , más preferiblemente al menos 10^6 , más preferiblemente al menos 10^7 , más preferiblemente al menos 10^8 y, lo más preferible, al menos 10^9 polipéptidos diferentes.

En realizaciones particulares de la invención, el anclaje es un polipéptido funcional como anclaje en la superficie de una célula eucariota y también es funcional como anclaje en la superficie de un fago. En otras realizaciones, el anclaje es una porción de una proteína de superficie que se anclaje a la superficie celular de una célula hospedadora eucariota y a la superficie de un fago.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el anclaje y una cadena del polipéptido multi-cadena se expresan como una proteína de fusión. En otras realizaciones, el anclaje y una cadena del polipéptido multi-cadena se unen en la expresión a través de un enlace indirecto tal como, preferiblemente, un enlace Jun/Fos.

En otra realización, la invención se refiere a un método para expresar en la superficie de una célula hospedadora eucariota un polipéptido multi-cadena biológicamente activo que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, que comprende las etapas de introducir en una célula hospedadora eucariota un primer vector eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica una primera cadena polipeptídica de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo, ligado a un anclaje de la superficie celular, donde dicho vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de dicha primera cadena; y un segundo vector eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena polipeptídica de dicho polipéptido multi-cadena, donde dicho vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de dicha segunda cadena, en el que una célula hospedadora eucariota transformada con dicho primer vector eucariota y dicho segundo vector eucariota muestra, tras la expresión de los citados primer y segundo polinucleótidos, la actividad biológica de dicho polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula hospedadora eucariota; y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones apropiadas para la expresión de dichos primer y segundo polinucleótidos.

En una realización adicional, la invención se refiere a un método para presentar en la superficie de una célula hospedadora eucariota un polipéptido multi-cadena que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, que incluye las etapas de introducir en una célula hospedadora eucariota un vector de presentación eucariota, un conjunto de vectores de presentación eucariotas o un vector de presentación dual, como se ha descrito anteriormente, y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión de dichos polinucleótidos.

La presente invención proporciona, además, una célula hospedadora eucariota que comprende un vector de presentación eucariota, un conjunto de vectores de presentación eucariotas o un vector de presentación dual, tal como se ha descrito en este documento. Las células hospedadoras eucariotas adecuadas pueden ser células animales, células de planta o células fúngicas. Preferiblemente, la célula hospedadora eucariota será una célula de mamífero, una célula de insecto y una célula de levadura. Más preferiblemente, la célula hospedadora eucariota será una célula de levadura, por ejemplo, seleccionada de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Debaromyces* o *Candida*. Los hospedadores de levaduras preferidos incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. La célula hospedadora más preferida es *Saccharomyces cerevisiae*.

Breve descripción de los dibujos

Los objetos, las características y las ventajas de la invención mencionados anteriormente y otros resultarán evidentes a partir de la descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, tal como se ilustra en los dibujos adjuntos, en los que caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes en las diferentes vistas. Los dibujos no necesariamente están realizados a escala, sino que, por el contrario, se hace énfasis en ilustrar los principios de la invención.

La Fig.1 es un diagrama esquemático que ilustra el sistema de transferencia presentación en fago-presentación eucariota. La información genética que codifica las cadenas de un polipéptido Fab se transfiere desde un vector de presentación en fago a un vector eucariota polipeptídico de la presente invención en forma de un único ácido nucleico escindido. A continuación, se sustituyen (si los hay) los elementos genéticos no deseados que intervienen.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático que ilustra el sistema de transferencia presentación en fago/presentación eucariota, en el que la información genética que codifica las cadenas de un polipéptido Fab se transfiere de forma independiente y separada desde un vector de presentación en fago hasta un vector de presentación eucariota de la presente invención.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático del vector de presentación en levadura multi-cadena, pTQ3, de acuerdo con la invención, que presenta sitios únicos de clonación para la inserción de al menos dos cadenas de un polipéptido multi-cadena (por ejemplo, componentes ligero y pesado de Fab), con elementos adicionales, dispuestos de tal forma que las dos cadenas se expresan de modo independiente mediante la inducción de los promotores GAL1 en tándem.

En este vector, una primera cadena (por ejemplo, una cadena ligera de Ig), insertada como un fragmento *ApaI/AscI*, se expresa como una proteína secretora soluble usando la secuencia señal Aga2p (Aga2p/ss) y se fusiona con un marcador de epítipo HA. Una segunda cadena (por ejemplo, un fragmento de cadena pesada de Ig), insertada como un fragmento *StiI/NotI*, se expresa como una proteína de fusión unida a la superficie celular usando la Aga2p/ss y la subunidad de la proteína de anclaje (Aga2p madura). La segunda cadena se fusiona de manera similar con un marcador de epítipo myc. También se indican otros elementos de utilidad para la replicación de plásmidos (por ejemplo, pMB1-ori y Cen6/ARSH4) y útiles como marcadores selectivos (es decir, *ampR* y *TRP*).

Las Figs. 4A-4C son representaciones de datos que demuestran la expresión independiente de proteínas de fusión. La Fig. 4A muestra la expresión de la proteína de fusión de 45 kD Aga2p-V_H-C_H¹ en células hospedadoras de levadura EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pTQ3-PH1 y la Fig. 4B muestra la expresión de la cadena V_L-C_L de 30 kD en células hospedadoras de levadura EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pTQ3-PH1. No se detectaron productos de fusión en ninguno de los controles de vectores vacíos. Para cada célula hospedadora, se prepararon muestras tanto antes (-) como después (+) de la inducción con galactosa de los promotores GAL1 funcionales en los vectores de presentación en levadura. La Fig. 4C es una representación de la detección de inmunofluorescencia de anticuerpos Fab ensamblados en la superficie de la célula de levadura, (a) contraste de fase (b) detección de HC (c) detección de ofLC.

Las Figs. 5A-C representan una serie de gráficos de citometría. La Fig. 5A muestra células de levadura transformadas con pTQ3-F2 (panel izquierdo) y pTQ3-PHI (panel derecho); las construcciones se dejaron sin calentar (línea de puntos) o se indujeron durante 48 horas a 20°C (línea de color gris claro). La presentación de cadena pesada (a), cadena ligera (b) y unión a antígeno (c) se analizaron usando citometría de flujo.

La Fig. 6 es un gráfico de histograma que ilustra el ELISA de células enteras de tres Fab anti-estreptavidina presentados en la superficie de células hospedadoras de levadura EBY100 pTQ3-F2, EBY100 pTQ3-A12 y EBY100 pTQ3-4C8. Se indican, respectivamente, la unión a antígeno, la presentación de LC y la presentación de HC.

La Fig. 7 es un gráfico de citometría de una mezcla de células de levadura. EBY100 pTQ3-F2, EBY100 pTQ3-A12 y EBY100 pTQ3-A12/pESC se marcaron doblemente tanto para la unión a antígeno como presentación de LC. Se indica un gráfico de la presentación de LC frente a la unión a antígeno y una "supervisión" de la unión a antígeno normalizado.

Las Figs. 8A-8D son representaciones de datos que muestran la unión a repertorios de levaduras y clones de levadura seleccionados individualmente con diferentes concentraciones de antígeno; la Fig. 8A muestra una serie de histogramas de unión a antígeno y presentación de Fab para la biblioteca no seleccionada (a) y los rendimientos policlonales de las rondas de selección 1, 2 y 3 (b, c, d). El repertorio de levaduras anti-estreptavidina diversificado se sometió a tres rondas de FACS. Se indica el control de clasificación usado en cada selección de biblioteca. La Fig. 8B muestra el análisis por FACS policlonal a diferentes concentraciones de antígeno de una campaña de selección por afinidad FACS de un repertorio anti-estreptavidina. Una serie de gráficos de citometría bi-variente marcados tanto para la unión a antígeno como para la expresión de Fab muestra un incremento en la población de células de levadura, que expresan el F2 natural (representado por "o") y de los mutantes R2E (representados por triángulos), R3B1 (representados por cuadrados) y R3H3 (representados por trapecios), marcadas con anti-mAb y estreptavidina-PE. Se supervisó en el tiempo la fluorescencia media para la unión de estreptavidina. Se calcula la constante del índice de disociación a partir de la pendiente de la línea. La Fig. 8D muestra una serie de gráficos de citometría de dos campañas de selección utilizando Kingfisher en combinación con FACS (columna izquierda) o FACS sola (columna derecha). Los gráficos de citometría indican el porcentaje creciente de células de unión a antígeno en la ronda no seleccionada (a) y las rondas 1 (b) y 2 (c) de selección.

La Fig. 9 es un diagrama esquemático del vector de presentación en levadura de cadena pesada, pTQ5-HC, de acuerdo con la invención, con un inserto de cadena pesada bajo el control de un promotor GAL1 inducible. El fragmento de cadena pesada de Ig se sitúa como un fragmento del inserto *StiI/NotI* y se expresa como una proteína de fusión unida a la superficie de la célula usando la secuencia señal Aga2p (Aga2p/ss) y la subunidad de la proteína de anclaje (proteína Aga2p). El fragmento de cadena pesada (HC) se fusiona a través de un marcador de epítipo myc. Igualmente, se indican otros elementos necesarios para la replicación de plásmidos (es decir, pMB1-ori y Cen6/ARSH4), apareamiento de levaduras (es decir, el terminador *Mata*) y útiles como marcadores selectivos (es decir, *ampR* y *TRP*).

La Fig. 10 es una representación de una transferencia de Western que demuestra la expresión del producto de fusión de 45 kD Aga2p-HC tal como se detecta con un anticuerpo anti-c-Myc en la célula parental de levadura haploide EBY100 pTQ5-HC (carril 2), en comparación con la célula hospedadora de levadura de vector vacío (control) EBY100 pTQ5 (carril 1) y la célula hospedadora de levadura de vector de presentación de Fab EBY100 pTQF2 (carril 3).

La Fig. 11 es una serie de gráficos de citometría que muestran la presentación de HC en la superficie de células de levadura, sin la presencia de una cadena ligera en tiempo igual a cero (es decir, fondo; líneas negras continuas) y 48 horas después de la inducción (líneas de puntos). Se marcaron células de levadura EBY100 pTQ5-HC y células de

levadura de control EBY100 pTQ5 con anti-C_H¹ y FITC anti-Ig de ratón de conejo para detectar la presencia de la HC, y también con FITC de estreptavidina (strep-FITC) para detectar la actividad de unión a antígeno en la superficie de la levadura. La HC sólo se puede observar presentada en la superficie de la célula de levadura, pero carece de cualquier actividad de unión a antígeno en ausencia de una LC apareada.

La Fig. 12 es un diagrama esquemático del vector de presentación en levadura de cadena ligera, pTQ6-LC, de acuerdo con la invención, que posee un inserto de cadena ligera bajo control de un promotor GAL1 inducible. La cadena ligera de Ig está situada como un fragmento de inserto *Apal/AscI* y se expresa como una proteína soluble que usa la Aga2/ss. El fragmento de cadena ligera (LC) se fusiona también con un marcador de epítipo HA. Se indican, igualmente, otros elementos de utilidad para la replicación de plásmidos (por ejemplo, pUC1-ori y Cen6/ARSH4) y útiles como marcadores de selección (es decir, *ampR* y Blastocidin®).

La Fig. 13 es una representación de una transferencia de Western que demuestra la expresión del polipéptido de cadena ligera de 60 kD, tal como se detecta en el sobrenadante del cultivo con un anticuerpo anti-HA en la célula parental de levadura haploide W303 pTQ6-LC (carril S2), comparada con la célula hospedadora de levadura de vector vacío (control) W303 pYC6 (carril S1).

La Fig. 14 es el gráfico de un histograma que ilustra la determinación por ELISA de células enteras de la actividad de anclaje de estreptavidina en la superficie celular de células de levadura parentales haploides (W303 pTQ6-LC y EBY100 pTQ5-HC), comparado con la célula de levadura diploide derivada (LC/HC DIPLOIDE) y la célula hospedadora de vector vacío de control W303 pYC6 y la célula hospedadora de levadura de vector de presentación de Fab convencional.

Figs. 15A-15C son una serie de histogramas FACS que muestran la unión a antígeno y la expresión de cadena ligera en una célula parental HC haploide anti-estreptavidina (A) y un control diploide que contiene plásmidos de presentación de LC y HC vacíos (B) y un diploide positivo que expresa un Fab específico de estreptavidina en su superficie (C).

La Fig. 16 es una representación de una transferencia de Western que demuestra la expresión del polipéptido de LC de 30 kD, tal como se detecta con un anticuerpo anti-HA en la célula de levadura diploide formada por el apareamiento de EBY100 pTQ5-HC con W303 pTQ6-LC (carril 3), en comparación con la célula de levadura diploide (de control) formada por el apareamiento de EBY100 pTQ5 con W303 pYC6 (carril 2) y la célula hospedadora de levadura parental de vector LC W303 pTQ6-LC (carril 1).

La Fig. 17 es una ilustración de una transferencia de Western que demuestra la expresión del producto de fusión de 45 kD Aga2p-HC, detectada con un anticuerpo anti c-Myc en la célula de levadura diploide formada por el apareamiento de EBY100 pTQ5-HC con W303 pTQ6-LC (carril 5), en comparación con la célula de levadura diploide (de control) formada por apareamiento de EBY100 pTQ5 con W303 pYC66 (carril 4), la célula hospedadora de levadura del vector de HC EBY100 pTQ5-HC (carril 3), la célula hospedadora de levadura de vector de presentación de Fab convencional EBY100 pTQ3F2 (carril 2), y la célula hospedadora de levadura de vector vacío EBY100 pTQ5 (carril 1).

Las Figs. 18A-18C son representaciones de la detección de inmunofluorescencia de anticuerpos Fab unidos de manera combinatoria en la superficie de células diploides de levadura (A), presentación de LC (B), presentación de HC (C), unión a antígeno. La fila superior muestra inmunofluorescencia y la inferior, el contraste de fase.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describen las realizaciones preferidas de la invención.

La invención que se detalla en la presente solicitud describe la primera demostración de expresión, transporte, unión e inmovilización (o “presentación”) satisfactoria de un polipéptido multi-cadena heterólogo funcional (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo Fab) en la superficie de una célula hospedadora eucariota (por ejemplo, levadura). La presente invención hace posible la construcción de bibliotecas de vectores y bibliotecas de células hospedadoras eucariotas, donde las células expresan un repertorio altamente variable de polipéptidos multi-cadena, los cuales muestran un alto grado de diversidad de secuencia dentro del repertorio y, en consecuencia, un intervalo altamente variable de actividades biológicas tales como especificidad frente a una diana (por ejemplo, antígeno). El especialista en la técnica podrá observar que siguiendo las instrucciones de la presente invención, es posible expresar una amplia selección de moléculas multi-cadena de manera estable en la superficie de células hospedadoras eucariotas tales como levaduras.

Definiciones

A menos que se defina de otra forma en este documento, el lenguaje y la terminología usados en la descripción de la presente invención se utilizan con el significado habitual de dicho lenguaje y terminología, comprendido y aceptado en general por los especialistas en la técnica. En un intento de evitar cualquier confusión o ambigüedad latente, se exponen a continuación elementos y características particulares en relación con la presente invención.

Como se usa en este documento, un “polipéptido multi-cadena” se refiere a un polipéptido funcional compuesto por dos o más elementos polipeptídicos específicos (es decir, “cadenas”), unidos de forma covalente y no covalente entre sí por una asociación molecular diferente de la unión peptídica. Las cadenas de un polipéptido multi-cadena pueden ser iguales o diferentes. Un ejemplo destacado de un polipéptido multi-cadena es una inmunoglobulina (por ejemplo, 5 IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), compuesta típicamente por cuatro cadenas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que se combinan en un polipéptido multi-cadena en el que las cadenas están unidas a través de varios enlaces disulfuro (covalente). Los fragmentos Fab de inmunoglobulina activa, que implican una combinación de un dominio de cadena ligera (LC) y un dominio de cadena pesada (HC), constituyen una forma especialmente importante de polipéptidos multi-cadena. Además de formar un enlace disulfuro, las LC y HC de un Fab son conocidas también por asociarse 10 de forma eficaz (de manera no covalente) en ausencia de cualquier puente disulfuro. Otros ejemplos de polipéptidos multi-cadena incluyen, pero sin limitación, moléculas de los dominios extracelulares del receptor de células T (TCR) (que comprenden cadenas α y β , o cadenas γ y δ), y moléculas de MHC de clase II (que comprenden cadenas α y β). En este documento, se contempla específicamente la expresión de los dominios de unión TCR y MHC en la célula hospedadora eucariota, en donde al menos una cadena se ancla a la superficie de la célula hospedadora con un anclaje 15 de origen no natural (heterólogo).

La expresión “biológicamente activo”, cuando se refiere, por ejemplo, a un polipéptido multi-cadena, significa que el polipéptido muestra una funcionalidad o propiedad que resulta útil en relación con algún proceso, vía o reacción biológica. La actividad biológica se puede referir, por ejemplo, a una capacidad para interactuar o asociarse 20 con (por ejemplo, unirse) con otro polipéptido o molécula, o puede hacer referencia a una capacidad para catalizar o regular la interacción de otras proteínas o moléculas (por ejemplo, reacciones enzimáticas). Actividad biológica puede referirse también a la capacidad para alcanzar una característica de conformación física de una estructura de origen natural tal como la conformación de cuatro cadenas de las moléculas de inmunoglobulina gamma (IgG) de origen natural, las cadenas α y β de una molécula de receptor de células T o la conformación de un antígeno que presenta una estructura de un complejo de histocompatibilidad importante (por ejemplo, el surco MHC 25 péptido).

Como se usa en este documento, “vector” se refiere a cualquier elemento capaz de servir como vehículo de transferencia genética, expresión génica o replicación o integración de un polinucleótido ajeno en una célula hospedadora. Vector puede ser un cromosoma o plásmido artificial, y puede estar integrado en el genoma de la célula 30 hospedadora o existir en forma de elemento genético independiente (por ejemplo, episoma, plásmido). Un vector puede existir como un único polinucleótido o como dos o más polinucleótidos separados. Un “vector de presentación multi-cadena” de la presente invención es capaz, en el hospedador apropiado, de dirigir la expresión de al menos una cadena de un polipéptido multi-cadena y procesar su expresión en la superficie de dicho hospedador. Vectores de acuerdo con la presente invención pueden ser vectores de copia simples o vectores multicopia (que indica el número de copias del vector que se mantiene típicamente en la célula hospedadora). Vectores preferidos de la presente invención incluyen vectores de presentación en levadura, especialmente vectores 2μ y vectores centroméricos. En la técnica, se conoce como “vector lanzadera” (o vector bifuncional) cualquier vector capaz de repli- 35 carse en más de una especie de organismo. Por ejemplo, se puede construir un vector lanzadera capaz de replicarse tanto en *Escherichia coli* (*E. coli*) como en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) enlazando secuencias de un plásmido de *E. coli* con secuencias del plásmido 2μ de la levadura. Una realización especialmente preferida de la presente invención es un “vector de presentación dual”, que es un vector lanzadera capaz no sólo de replicarse en dos especies diferentes, sino también de expresar y presentar polipéptidos heterólogos en dos o más especies 40 hospedadoras.

Como se usa en este documento, “secreción” se refiere a péptidos que tienen una señal de secreción y son procesados en el retículo endoplásmico. Si los péptidos secretados contienen secuencias de anclaje o se asocian con el exterior de la superficie celular, se dice que los péptidos se “presentan”. Tal como se usa en este documento, “presentación” y “presentación en superficie” (que se utilizan indistintamente en este documento) se refieren a un 50 fenómeno en el que un polipéptido heterólogo está unido o “anclado”, a la superficie exterior de un fago o célula hospedadora, por lo que el polipéptido anclado queda expuesto al entorno extracelular. La presente invención se refiere particularmente a la presentación de un polipéptido multi-cadena en la superficie de una célula hospedadora eucariota, mediante la expresión de cada una de las cadenas en la célula hospedadora y el anclaje de al menos una cadena del polipéptido multi-cadena a la superficie de la célula hospedadora. Un “vector de presentación” se refiere a un vector que es capaz de expresar un polipéptido en una célula hospedadora o fago, de manera que el polipéptido expresado se presenta en la superficie de dicha célula hospedadora o fago. Los vectores de presentación de la presente invención dirigen la expresión de polipéptidos multi-cadena en una célula hospedadora o fago, de modo que en la superficie de la célula hospedadora o del fago se muestra la actividad biológica del polipéptido presentado. Los 55 vectores de presentación dual de esta invención dirigen la expresión de polipéptidos multi-cadena en al menos dos hospedadores diferentes (preferiblemente, por ejemplo, una célula hospedadora procariota y una célula hospedadora eucariota), de manera que la actividad biológica del polipéptido se muestra en la superficie de los correspondientes hospedadores.

El término “repertorio” se refiere a una población de diversas moléculas, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que difieren en la secuencia de nucleótidos, o polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos. De acuerdo 60 con la presente invención, un repertorio de polipéptidos se diseña, preferiblemente, para que tenga una población diversa de moléculas que difieren en sus sitios de anclaje por una molécula diana. Los polipéptidos del repertorio se diseñan para que tengan elementos estructurales comunes, por ejemplo, como sucede en un repertorio de Fab, que

poseen una estructura bicatenaria bien reconocida (cadena ligera de Ig asociada con los dominios V_H y C_H^1 de una cadena pesada de Ig), pero que muestran diferentes especificidades de unión debido a la variación en las regiones variables correspondientes de las cadenas de componente.

5 El término “biblioteca” se refiere a una mezcla de polipéptidos o polinucleótidos heterogéneos. Una biblioteca está compuesta por miembros que poseen secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas similares. Cuando la biblioteca es una biblioteca de polinucleótidos, codifica un repertorio de polipéptidos (particularmente, por ejemplo en relación con la presente invención, un repertorio de polipéptidos multi-cadena). Las diferencias de secuencia entre los miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede adoptar la forma de una simple mezcla de polipéptidos o polinucleótidos o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo, bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, que se transforman con una biblioteca de polinucleótidos. Cuando los polipéptidos heterogéneos se expresan y muestran en la superficie de las células u organismos que forman la biblioteca, se trata de una “biblioteca de presentación”. De manera conveniente, se incorporan polinucleótidos en los vectores de presentación con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una biblioteca puede adoptar la forma de una población de organismos hospedadores, en donde cada organismo contiene una o múltiples copias de un vector de presentación que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de polinucleótido, que se puede expresar para producir el correspondiente miembro polipeptídico. De esta manera, la población de organismos hospedadores tiene el potencial de codificar un amplio repertorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas.

La presente invención se refiere a vectores de presentación multi-cadena nuevos. En una realización de la presente invención, los polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multi-cadena se hallan presentes en vectores de presentación separados (es decir, dos o más), cuya compilación da lugar a un “conjunto de vectores” de presentación funcional (el término general “vector” comprende conjuntos de vectores). Por ejemplo, si el polipéptido multi-cadena fuera un polipéptido bicatenario compuesto por la cadena ligera y la cadena pesada de un Fab biológicamente activo, el polinucleótido que codifica la LC se puede incorporar en un vector de presentación, y el polinucleótido que codifica la HC se puede incorporar en un segundo vector de presentación, separado (más preferiblemente, expresado como una proteína de fusión de anclaje a HC). De manera individual, cada vector es capaz de expresar su correspondiente cadena polipeptídica; los dos vectores juntos forman un conjunto de vectores compatible, el cual codifica las cadenas de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo. De modo similar, células hospedadoras separadas, cada una de ellas transformada con los diferentes vectores de un conjunto de vectores, forman colectivamente un conjunto compatible de células hospedadoras (o, específicamente, en el caso de un conjunto de dos vectores, un “par de células”). Los vectores y conjuntos de vectores incluirán, preferiblemente, también uno o múltiples marcadores seleccionables (por ejemplo, *TRP*, *ampR* y similares) para facilitar la selección y propagación de hospedadores eficazmente transformados.

Una “célula hospedadora” se refiere a cualquier célula (procariota o eucariota) transformada para contener un vector. De acuerdo con la presente invención, células hospedadoras preferidas son células bacterianas y células eucariotas, incluidas, pero sin limitación, células protistas, células fúngicas, células de planta y células animales. Las células hospedadoras de la invención pueden ser de cualquier construcción genética pero, preferiblemente, son células haploides, diploides o multiploides (por ejemplo, como es típico de las líneas celulares inmortalizadas en cultivo). Células hospedadoras preferidas incluyen células de insecto (por ejemplo, Sf9), células de mamífero (por ejemplo, células CHO, células COS, células del mieloma SP2/0 y NS/0, células de riñón embrionario (HEK 293), células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células B humanas, la línea celular humana PER.C6TM (Crucell), células de semillas de planta y células de *Ascomycetes* (por ejemplo, células de *Neurospora* y levadura; especialmente, levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*). Ejemplos de especies de levadura preferidas incluyen *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Una célula hospedadora de levadura especialmente preferida es *S. cerevisiae*.

El término “fago” se refiere a un “bacteriófago”, que es un virus bacteriano que contiene un núcleo de ácido nucleico y una cubierta protectora proteínica. En este documento, los términos “bacteriófago” y “fago” se utilizan indistintamente. A menos que se indique lo contrario, los términos “bacteriófago” y “fago” comprenden también “fagémidos” (es decir, bacteriófago cuyo genoma incluye un plásmido que se puede empaquetar por co-infección de una célula hospedadora con un fago auxiliar). En realizaciones preferidas de la presente invención, el fago es un fago M13.

Las expresiones “anclaje”, “anclaje de superficie celular” y “polipéptido de anclaje” se refieren a un resto polipeptídico que, tras su expresión en una célula hospedadora, queda unido o asociado de otra forma con la superficie exterior de la célula hospedadora o, en el caso de un sistema de presentación en fago, en la superficie de una partícula de fago (por ejemplo, como parte de la cápside o como parte de un filamento). Un polipéptido de anclaje puede ser un resto de proteína de cubierta, un resto de proteína transmembrana, o puede ser un resto de polipéptido unido de otra manera con la superficie celular (por ejemplo, a través de una modificación post-traducciona, tal como por un puente de fosfatidil-inositol o disulfuro). La expresión comprende proteínas nativas para la célula hospedadora o fago o proteínas exógenas introducidas con el fin de anclarse a la pared de una célula hospedadora o a la cubierta de un fago. Los anclajes incluyen cualquier modificación o truncamiento sintético de un anclaje de origen natural que conserva todavía la capacidad para estar unido a la superficie de una célula hospedadora o de una partícula de fago. Restos de

proteínas de anclaje preferidos están contenidos, por ejemplo, en las proteínas de la superficie celular de una célula eucariota. Anclajes eficaces incluyen partes de una proteína de la superficie celular suficientes para proporcionar un anclaje superficial cuando se fusionan con otro polipéptido tales como una cadena de un polipéptido multi-cadena de acuerdo con esta invención. También se contempla el uso de pares de proteínas codificadas y expresadas por separado, pero que se asocian a la superficie de una célula por enlaces covalentes (por ejemplo, disulfuro) o no covalentes como anclaje adecuado y, en este sentido, se mencionan en particular los componentes α -aglutinina de la levadura, Aga1p y Aga2p, que forman un complejo unido por disulfuro e inmovilizado por glicanos en la superficie de las células de levadura. Otro par de proteínas que se puede utilizar como anclaje son proteínas que forman interacciones de “cremallera de leucina” y similares tales como las proteínas nucleares Jun y Fos (que forman un “enlace jun/fos”). Por ejemplo, se puede diseñar un vector de presentación de acuerdo con la invención para dirigir la expresión en una célula hospedadora de una primera cadena de un polipéptido multi-cadena fusionada con el resto de la cremallera de leucina de Jun y se puede diseñar un segundo vector para dirigir la expresión independiente del resto de la cremallera de leucina de Fos, fusionado a una proteína de superficie del hospedador. Tras la expresión de los genes estructurales del vector, el polipéptido de la primera cadena se asociará (es decir, quedará anclado) con la superficie de la célula hospedadora a través de un enlace jun/fos, dado que la cremallera de leucina de Jun y Fos forma un enlace entre el polipéptido de la primera cadena y la proteína de superficie de la célula hospedadora fusionado con la parte Fos de la cremallera. Se puede usar cualquier par de unión de proteínas apropiado. Los ejemplos preferidos de anclajes polipeptídicos incluyen la proteína de recubrimiento pIII del fago filamentoso o fragmentos de la misma (por ejemplo, dominio de anclaje pIII o “muñón”, véase la Patente de EE.UU. No. 5.658.727) para sistemas de presentación en fago y para sistemas de presentación en levadura FLO1 (una proteína asociada con el fenotipo de floculación en *S. cerevisiae*), α -aglutinina y α -aglutinina (por ejemplo, subunidades de Aga1p y Aga2p) y fragmentos funcionales de las mismas.

Como se usa en este documento, la expresión “proteína de fusión” indica un polipéptido híbrido, compuesto por secuencias de aminoácidos de más de una fuente, unidas entre sí para formar un polipéptido unitario que no es de origen natural. Las proteínas de fusión se preparan, por ejemplo, uniendo operativamente secuencias codificadoras para las secuencias de aminoácidos de componente en fase, de modo que, tras su expresión, las mismas se producen como un polipéptido único. De manera alternativa, las proteínas de fusión se pueden ensamblar de forma sintética, por ejemplo, creando un enlace peptídico entre dos o más polipéptidos separados.

Como se usa en este documento, “unido” se refiere a una conexión funcional y estructural entre dos o más elementos. Como se utiliza en este documento, los elementos unidos se refieren típicamente a una conexión funcional entre dos o más elementos polinucleotídicos o polipeptídicos. Por ejemplo, tal como se ha analizado anteriormente, se puede unir un polipéptido a una proteína de anclaje (a través de un enlace peptídico o a través de un enlazador peptídico), formando de ese modo una proteína de fusión. De manera similar, los polinucleótidos que codifican el polipéptido y la proteína de anclaje pueden estar unidos de forma que la proteína de fusión se transcribe y traduce como un mensaje de ARN unitario. Los polipéptidos también pueden estar unidos indirectamente a un anclaje a través de una asociación intermedia, un ejemplo de lo cual es el uso de la interacción de alta afinidad de las cremalleras de leucina Jun y Fos (es decir, un “enlace jun/fos”) para unir de forma eficaz un polipéptido a la superficie de un fago o una célula hospedadora (Cramer, R. y Blaser, K., 1996). Se puede utilizar cualquier par heterodimérico u homodimérico adecuado de moléculas (Chang, H. *et al.*, 1994; Moll, J. *et al.*, 2001; Pu, W. y Struhl, K., 1993).

Los especialistas en la técnica apreciarán que los polinucleótidos, que codifican una o más cadenas de un polipéptido multi-cadena que se tiene que expresar y presentar en un sistema de presentación en fago o de presentación en una célula hospedadora, pueden estar unidos operativamente a un promotor (para facilitar la transcripción) o unidos operativamente con una secuencia señal o péptido líder (para facilitar el procesamiento celular y el transporte a la superficie). Estos elementos de control genético y las uniones funcionales a los mismos son numerosos y bien conocidos en la técnica y la presente invención no se limita a su uso. Sin embargo, los promotores preferidos incluyen promotores inducibles. Promotores especialmente preferidos (para sistemas eucariotas) incluyen los que son útiles en vectores de levadura tales como pGAL1, pGAL1-10, pGAL1104, pGAL10, pPGK, pCYC1 y pADH1. Otros promotores preferidos incluyen el promotor LacZ (para sistemas no eucariotas). Las secuencias señal especialmente preferidas incluyen la secuencia señal Aga2p (para sistemas eucariotas) y la secuencia señal pIII (para sistemas no eucariotas).

Otra herramienta de utilidad conocida por los especialistas en la técnica son las etiquetas moleculares o “marcadores” (por ejemplo, marcadores de epítipo, genes informadores, radioisótopos, restos fluorescentes o quimioluminiscentes, etc.) que facilitan la capacidad del facultativo para, por ejemplo, detectar la presencia de un polipéptido unido a las mismas. Los marcadores de epítipo (por ejemplo, segmentos de péptidos reconocidos por anticuerpos particulares o restos de unión) son especialmente útiles en este documento, en el sentido de que se pueden coexpresar como un miembro de fusión con una o más cadenas de un polipéptido multi-cadena en un vector o vectores de acuerdo con la invención, para permitir la detección de la expresión de una o más cadenas con las que el marcador se coexpresa. Tal como se conoce y utiliza en la técnica, los marcadores se sitúan típicamente bajo los mismos controles genéticos como un gen de interés (preferiblemente, como un componente de una proteína de fusión expresada). Si y cuando el producto génico de interés no se puede detectar fácilmente, el marcador proporciona una señal fácilmente detectable y, a menudo, cuantificable que indica la presencia del producto génico de interés. Mediante la unión de un marcador a un producto polipeptídico génico de interés, el facultativo puede controlar procesos tales como, por ejemplo, expresión

génica, tráfico de polipéptidos, presentación extracelular e interacciones proteína-proteína (Fields, S. y Sternglanz, R., 1994; Phizicly, E. y Fields, S., 1995).

En consecuencia, las cadenas del polipéptido multi-cadena pueden estar opcionalmente unidas a uno o más marcadores, ya sea individual o conjuntamente. En la técnica se conoce una diversidad de marcadores y están disponibles en el mercado (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Applied Biosystems, Foster City, CA; Promega, Madison, WI; Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN; Stratagene, La Jolla, CA). Preferiblemente, la unión se consigue a través de un enlace peptídico (creando de esta forma una proteína de fusión), en donde el polinucleótido que codifica una cadena de un polipéptido multi-cadena se une a un marcador (por ejemplo, un marcador de epítipo). Los marcadores preferidos incluyen marcadores poli-His, marcadores HA y marcadores myc.

Como se usa en este documento, el término “recombinante” se utiliza para describir ácidos nucleicos alterados o manipulados de forma no natural, células hospedadoras transfectadas con ácidos nucleicos exógenos, o polipéptidos expresados de manera no natural, a través de la manipulación de ADN aislado y la transformación de células hospedadoras. “Recombinante” es un término que comprende específicamente moléculas de ADN que se han construido *in vitro* usando técnicas de ingeniería genética, y el uso del término “recombinante” como adjetivo para describir una molécula, construcción, vector, célula, polipéptido o polinucleótido excluye específicamente las moléculas de origen natural.

Del mismo modo, el término “transformar” se refiere en general a cualquier método artificial (es decir, controlado por el facultativo) para introducir material genético en una célula o fago, sin limitación del método de inserción. De manera específica y aplicada a la presente invención, el término “transformante” se refiere a una célula hospedadora que se ha transformado y comprende, por ejemplo, células diploides, que son producto de la fusión controlada de pares de células haploides compatibles (tal como sucede con el apareamiento controlado de esporas haploides de levadura de tipo de apareamiento opuesto).

Los métodos para “transferir” información sobre secuencias de ácido nucleico de un vector a otro no representan una limitación en la presente invención e incluyen una diversidad de técnicas de ingeniería genética o ADN recombinante conocidas en la técnica. Una vez más, se conoce en la técnica una extensa gama de métodos, que se describen en las referencias citadas en este documento. Las técnicas de transferencia especialmente preferidas incluyen, pero sin limitación, técnicas de digestión por restricción y de ligación (utilizando sitios de clonación únicos), protocolos de amplificación por PCR (utilizando secuencias de cebador específicas) y técnicas de recombinación homóloga (en las que se usan regiones polinucleotídicas de homología).

El uso de la tecnología de ingeniería genética requiere necesariamente el cultivo de células hospedadoras recombinantes (transformantes) en diversas condiciones especificadas, tal como se determina por las necesidades del organismo y el estado celular particular que desea el facultativo. Por ejemplo, el organismo puede poseer (de acuerdo con lo determine su disposición genética) ciertos requisitos nutricionales o una resistencia o sensibilidad particular frente a condiciones físicas (por ejemplo, temperatura) y/o químicas (por ejemplo, antibióticos). Además, pueden ser necesarias condiciones especiales de cultivo para inducir o reprimir la expresión de un gen deseado (por ejemplo, uso de promotores inducibles) o para iniciar un estado celular particular (por ejemplo, apareamiento o esporulación de células de levadura). Estas diversas condiciones y los requisitos para satisfacer tales condiciones son conocidos y comprendidos por los especialistas en la técnica.

En consecuencia, la práctica de distintos aspectos de la presente invención exige el cultivo de células hospedadoras en “condiciones apropiadas” o “condiciones suficientes” para lograr o inducir estados celulares determinados. Dichos estados celulares deseables incluyen, pero sin limitación: crecimiento y reproducción celular; la expresión, secreción o transporte, y asociación de las cadenas de un polipéptido multi-cadena de manera que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestre en la superficie de la célula hospedadora (o partícula de fago); la fusión de células haploides para formar una célula diploide (por ejemplo, fertilización, formación de cigoto, apareamiento de células de tipos de apareamiento opuestos); y la meiosis de una célula diploide para formar células hijas haploides (por ejemplo, gametogénesis, esporulación). La presente invención no se limita por los parámetros físicos y químicos de dichas “condiciones apropiadas”, pero las citadas condiciones están determinadas por los organismos y vectores usados para poner en práctica la invención, así como por las preferencias del facultativo.

Vectores de presentación eucariotas de polipéptido multi-cadena

Tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere a un nuevo vector genético, de utilidad en una célula eucariota para presentar un polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula, de modo que se muestre la actividad biológica del polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula. De acuerdo con la invención, el polipéptido multi-cadena se puede codificar en un único vector o un conjunto de vectores puede codificar cadenas individuales del polipéptido multi-cadena. Por ejemplo, en un aspecto de la invención, el vector puede estar presente como un conjunto de vectores, en el que cada cadena del polipéptido multi-cadena está codificada por uno de un par comparable de vectores, de manera que cuando el conjunto de vectores está presente en una única célula eucariota, las cadenas del polipéptido multi-cadena se asocian en la superficie de la célula eucariota. En otro aspecto de la invención, el vector de presentación puede ser un vector de presentación dual, en donde el vector es capaz de (i) expresarse en una

célula eucariota y mostrar en la superficie de la célula eucariota un polipéptido multi-cadena biológicamente activo y (ii) expresarse en una célula eucariota y mostrar en la superficie de un bacteriófago el polipéptido multi-cadena biológicamente activo.

Este polipéptido multi-cadena puede ser cualquier polipéptido compuesto por dos o más elementos polipeptídicos separados, a los que se denomina cadenas del polipéptido multi-cadena. Dichas cadenas están unidas covalente o no covalentemente (es decir, por una unión diferente de la peptídica) para formar un polipéptido biológicamente activo. Preferiblemente, el polipéptido multi-cadena codificado por el vector o los vectores de presentación multi-cadena de la presente invención existe como un polipéptido de dos, tres o cuatro cadenas. Las cadenas del polipéptido pueden ser idénticas (por ejemplo, un homodímero, -trímero o -tetramero) o diferentes (por ejemplo, un heterodímero, -trímero o -tetramero). Preferiblemente, el polipéptido multi-cadena es un polipéptido de dos o cuatro cadenas compuesto por dos cadenas diferentes. Más preferiblemente, el polipéptido multi-cadena se selecciona de un grupo de polipéptidos multi-cadena que consiste en receptores de células T, moléculas de MHC clase I, moléculas de MHC clase II, inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulinas biológicamente activos (por ejemplo, Fab). Más preferiblemente, el polipéptido multi-cadena es una IgA, IgD, IgE, IgG, IgM o un fragmento biológicamente activo de las mismas. Más preferiblemente, el polipéptido multi-cadena es un fragmento Fab de una Ig, en donde el primer polinucleótido del vector de presentación multi-cadena comprende un segmento que codifica los dominios V_H y C_H^1 de una cadena pesada de Ig y un segundo polinucleótido comprende un segmento que codifica una cadena ligera de Ig (es decir, dominios V_L y C_L).

Las cadenas del polipéptido multi-cadena (por ejemplo, primera cadena, segunda cadena, tercera cadena, etc.) se codifican como polinucleótidos (por ejemplo, primer polinucleótido, segundo polinucleótido, tercer polinucleótido, etc., respectivamente) en un vector de presentación. Los especialistas en la técnica apreciarán y reconocerán que las secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas no necesariamente tienen que estar insertadas en el plásmido idéntico o bajo el mismo control de expresión génica, para producir un polipéptido multi-cadena funcional. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de un Fab de Ig pueden estar localizados en plásmidos separados y transformarse como tales en una célula hospedadora idéntica para la co-expresión y co-procesamiento en un polipéptido multi-cadena funcional.

Los especialistas en la técnica apreciarán igualmente que las secuencias de los polinucleótidos que codifican las cadenas de un polipéptido multi-cadena no necesitan originarse en una fuente idéntica o en la misma fuente. Por ejemplo, se puede producir una molécula de Ig que tiene dominios variables (V_H y V_L) iguales a los de un anticuerpo monoclonal que posee una especificidad deseada, y dominios constantes (C_H^1 y C_L) de un anticuerpo monoclonal diferente, que posee propiedades deseadas (por ejemplo, otorgar compatibilidad humana o proporcionar un sitio de anclaje particular para el complemento).

Adicionalmente, el polinucleótido heterólogo que codifica las cadenas de un polipéptido multi-cadena (por ejemplo, dominios de Ig) puede estar variegado para producir una familia de homólogos polinucleotídicos que codifican cadenas polipeptídicas que varían ligeramente en sus secuencias de aminoácidos de una a otra, aunque tienen la misma estructura general. De esta forma, cuando se incorporan los homólogos a diferentes células hospedadoras y se expresan, se muestra una biblioteca de polipéptidos multi-cadena de secuencias variadas, proporcionando una biblioteca de presentación de péptidos adecuada para la exploración, por ejemplo, para descubrir polipéptidos multi-cadena homólogos que tienen una actividad biológica alterada. Dichas alteraciones en la secuencia de aminoácidos se pueden conseguir mediante mutaciones adecuadas o la síntesis parcial y reemplazo de sustituciones parciales o completas de regiones apropiadas de las correspondientes secuencias de codificación polinucleotídicas. Es posible obtener partes sustituidas de dominios constantes a partir de secuencias compatibles de ADN recombinante.

Dada una selección adecuada de componentes de vectores de presentación y células hospedadoras compatibles, las cadenas del polipéptido multi-cadena se expresarán en la superficie de células hospedadoras eucariotas. Los especialistas en la técnica apreciarán que esto se puede lograr usando cualquiera de una serie de construcciones de vectores de presentación variable y que la presente invención no está limitada por las mismas. El vector de presentación en sí mismo se puede construir o modificar a partir de cualquiera de una serie de vectores genéticos y elementos de control genético conocidos en la técnica y disponibles en el mercado (por ejemplo, en InVitrogen (Carlsbad, CA); Stratagene (La Jolla, CA); Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas VA)). Básicamente, la construcción del vector de la presente invención expresa las cadenas polipeptídicas para la presentación eficaz de un polipéptido multi-cadena totalmente ensamblado en la superficie de una célula eucariota transformada con el vector, de modo que se muestre la actividad biológica del polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula hospedadora.

Para lograr una expresión celular eficaz del polipéptido multi-cadena, los polinucleótidos que codifican cada una de las cadenas del polipéptido multi-cadena están unidos, preferiblemente, a un promotor de transcripción para regular la expresión de las cadenas polipeptídicas. El promotor eficaz debe ser funcional en un sistema eucariota y, opcionalmente (particularmente, en el caso de un vector de presentación dual), también debe ser eficaz como promotor procariota. En un vector de presentación dual particular, el promotor o los promotores eucariotas y el promotor o los promotores procariotas seleccionados para regular la expresión de las cadenas polipeptídicas heterólogas de un polipéptido multi-cadena pueden ser promotores idénticos o diferentes, con la condición de que sean apropiadamente funcionales en los organismos hospedadores pretendidos. De manera alternativa, se les puede seleccionar independientemente para

la expresión de cada cadena en un hospedador particular. El promotor eucariota puede ser un promotor constitutivo, pero preferiblemente es un promotor inducible. Con el fin de conseguir una expresión equilibrada y garantizar la inducción simultánea de la expresión, se prefiere una construcción de vector que utilice el mismo promotor para cada cadena.

En la técnica se conoce una serie de promotores eucariotas que son útiles en la presente invención. Promotores especialmente preferidos (para sistemas eucariotas) incluyen los que son útiles en vectores de presentación en levaduras tales como los promotores inducibles por galactosa, pGAL1, pGAL1-10, pGal4 y pGal10; el promotor de fosfoglicerato-quinasa, pPGK; promotor del citocromo c, pCYC1; y el promotor de alcohol deshidrogenasa 1, pADH1.

Preferiblemente, cada uno de los polinucleótidos que codifica una cadena de un polipéptido multi-cadena está unido también a una secuencia señal (o una secuencia de péptido líder). La secuencia señal actúa sobre el transporte directo (a veces, denominado secreción) de un polipéptido naciente en o a través de una membrana celular. Las cadenas de un polipéptido multi-cadena expresado en una célula eucariota a partir de un vector de la presente invención son transportadas al retículo endoplásmico (ER) para su ensamblaje y transporte hacia la superficie celular para su presentación extracelular. Una secuencia señal eficaz debe ser funcional en un sistema eucariota y, opcionalmente (especialmente en el caso de un vector de presentación dual), ésta debe ser eficaz también en un sistema procariota. Los polinucleótidos que codifican las cadenas de un polipéptido multi-cadena típicamente están unidos directamente en fase (ya sea inmediatamente adyacente al polinucleótido u, opcionalmente, unidos a través de una secuencia enlazadora o espaciadora), con una secuencia señal, generando así una proteína de fusión de cadena polipeptídica-péptido de secuencia señal. Preferiblemente, cada cadena de un polipéptido multi-cadena está fusionada con un péptido señal separado.

La secuencia señal que codifica el péptido señal puede ser idéntica o diferente en cada cadena del polipéptido multi-cadena. La secuencia señal puede ser nativa para el hospedador o heteróloga, siempre que sea funcional para determinar el transporte extracelular del polipéptido al que se fusiona. Los especialistas en la técnica conocen varias secuencias señal funcionales en la presente invención (por ejemplo, las secuencias señal M α 1 prepro, M α 1 pre, fosfatasa ácida Pho5, Invertasa SUC2, que actúan en levadura; secuencias señal pIII, PelB, OmpA, PhoA, funcionales en *E. coli*; líder gp64 funcional en células de insecto; líder IgK, secuencias señal de secreción de melitina en abeja, funcional en células de mamífero). Las secuencias señal se obtienen preferiblemente de proteínas secretoras nativas de la célula hospedadora. Las secuencias señal de eucariotas especialmente preferidas incluyen las de un factor de α -apareamiento de levadura; α -aglutinina de levadura, invertasa de *Saccharomyces*, inulinasa de *Kluyveromyces* y, más preferiblemente, el péptido señal de la subunidad Aga2p de la α -aglutinina (especialmente en realizaciones en las que el polipéptido de anclaje que se utiliza es el polipéptido Aga2p).

En una realización particularmente preferida, en la que el polipéptido multi-cadena es un Fab, el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica las regiones V_H y C_H¹ de una cadena pesada de Ig, y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica una cadena ligera de Ig.

El vector de presentación eucariota multi-cadena de la presente invención funciona en una célula hospedadora eucariota de manera que el polipéptido multi-cadena codificado por el vector se presenta en la superficie de la célula hospedadora. El anclaje ("adhesión" o "presentación") en la superficie de la célula hospedadora se logra enlazando al menos una cadena del polipéptido multi-cadena con un resto molecular unido a pared de la célula hospedadora. Más de una cadena del polipéptido multi-cadena puede estar unida a un anclaje, pero debido a que el polipéptido multi-cadena completamente ensamblado requiere (y, preferiblemente, contiene) solamente un punto de unión con la superficie de la célula hospedadora, solamente una cadena del polipéptido multi-cadena necesita ser el punto de unión celular. La expresión en la superficie de la célula se puede lograr enlazando al menos una de las cadenas polipeptídicas con una proteína de anclaje o un fragmento funcional (resto) de la misma. El anclaje eficaz debe ser funcional en un sistema eucariota y, opcionalmente (particularmente, en el caso de un vector de presentación dual), el anclaje debe ser eficaz también sobre la superficie de un bacteriófago. Preferiblemente, el anclaje es una proteína expresada en la superficie nativa de la célula hospedadora, por ejemplo, una proteína trans-membrana o una proteína enlazada con la superficie celular a través de un puente de glicano. Los especialistas en la técnica conocen varias proteínas de anclaje que son funcionales en la presente invención (por ejemplo, pIII, pVIII, LamB, PhoE, Lpp-OmpA, Flagelina (FIIC) o, al menos, sus porciones transmembrana, funcionales en procariotas/fago; el dominio transmembrana del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), anclajes de glicosilfosfatidil-inositol (GPI), funcionales en células de mamífero; anclaje gp64 en células de insecto y similares). Preferiblemente, cuando el hospedador es una levadura, la proteína de anclaje es α -aglutinina, α -aglutinina (con los sub-componentes Aga1p y Aga2p), o FLO1, que forman naturalmente una ligadura con la superficie celular de la levadura.

La ligadura de una cadena polipeptídica con un anclaje se puede conseguir, directa o indirectamente, por una diversidad de técnicas de biología molecular. La presente invención no está limitada por el método de ligadura de cadena-anclaje, sólo por el requisito funcional de que la cadena de polipéptido ligada esté inmovilizada sobre la superficie de la célula hospedadora (u opcionalmente del bacteriófago) como resultado de dicha ligadura.

Un método preferido de ligadura de cadena-anclaje es a través de la construcción de una proteína de fusión de cadena-anclaje. De manera similar y, preferiblemente, en concordancia con una proteína de fusión de cadena-péptido señal, un polinucleótido que codifica una cadena de un polipéptido multi-cadena está unido directamente, en fase (ya sea inmediatamente adyacente al polinucleótido u, opcionalmente, unido a través de una secuencia enlazadora o espaciadora), con un anclaje, generando de esta forma una proteína de fusión de péptido señal-cadena polipeptídica-anclaje.

En la técnica se conocen modos alternativos de ligadura péptido-péptido, que están disponibles para lograr una ligadura de cadena-anclaje eficaz de la presente invención. Por ejemplo, y como se ha citado anteriormente, una cadena del polipéptido multi-cadena puede estar unida indirectamente con un anclaje a través de una asociación intermedia tal como una interacción de alta afinidad de las cremalleras de leucina Jun y Fos (ligadura jun/fos) para enlazar de forma covalente una cadena polipeptídica con un anclaje de un fago o célula hospedadora (Cramer, R. y Suter, M., 1993; Cramer, R. y Blaser, K., 1996).

En la realización particularmente preferida, en la que el polipéptido multi-cadena es un fragmento Fab de Ig: el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica un anclaje Aga2p, y en fase con un segmento que codifica los dominios V_H y C_H^1 de una cadena pesada de Ig; y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica una cadena ligera.

Preferiblemente, los vectores de presentación multi-cadena de la presente invención ofrecen sitios de clonación para facilitar la transferencia de las secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas de un polipéptido multi-cadena. Estos sitios de clonación de vector comprenden al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción, situado para facilitar la escisión e inserción, en la fase de lectura, de segmentos polinucleotídicos. Se puede utilizar cualquiera de los sitios de restricción conocidos en la técnica en la construcción del vector de la presente invención. Además, se conocen técnicas de ingeniería genética que son de utilidad para incorporar sitios de restricción nuevos y únicos en un vector, y estos métodos son aplicados normalmente por los especialistas en la técnica. Un sitio de clonación puede comprender hasta un único sitio de restricción de reconocimiento de endonucleasa, para permitir la inserción o escisión de un único fragmento polinucleotídico. Más típicamente, se emplean dos o más sitios de restricción para proporcionar un mayor control de, por ejemplo, la inserción (por ejemplo, dirección de inserción) y una mayor flexibilidad de operación (por ejemplo, la transferencia dirigida de más de un fragmento polinucleotídico). Sitios de restricción múltiples pueden ser sitios de restricción idénticos o diferentes.

El vector de presentación eucariota multi-cadena de la presente invención contiene, preferiblemente, sitios de restricción situados en los extremos de las secuencias de codificación para las cadenas del polipéptido multi-cadena. Los sitios de restricción pueden estar situados en los extremos terminales 5' y 3' del segmento polinucleotídico, incluyendo todas las secuencias codificadoras para las cadenas de un polipéptido multi-cadena (en un único vector); o, más preferiblemente, los sitios de restricción pueden estar situados en los extremos 5' y 3' de cada segmento polinucleotídico que codifica una cadena del polipéptido multi-cadena. Más preferiblemente, cada uno de los sitios de restricción es único en el vector y diferente de los restantes sitios de restricción. Esta construcción de vector especialmente útil proporciona flexibilidad y control para la transferencia modular de secuencias polinucleotídicas individuales que codifican una cadena de un polipéptido multi-cadena.

En una construcción de vector especialmente preferida, en la que el polipéptido multi-cadena es un Fab, el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica un anclaje Aga2p, y en fase con un segmento que codifica las regiones V_H y C_H^1 de una cadena pesada de Ig, en donde la región de cadena pesada de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (por ejemplo, SfiI y NotI); y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica una cadena ligera de Ig, en donde la región de cadena ligera de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (por ejemplo, ApaI y AscI).

En una realización preferida del vector de presentación eucariota multi-cadena, una o más de las cadenas del polipéptido multi-cadena expresado por el vector en una célula hospedadora están unidas a un marcador molecular o gen informador. Preferiblemente, la ligadura es un enlace peptídico que une un marcador polipeptídico con una cadena del polipéptido multi-cadena. Una o más cadenas del polipéptido multi-cadena pueden estar marcadas usando marcas idénticas, similares o diferentes. Las marcas preferidas incluyen marcas de epítipo (Munro, S. y Pelham, H., 1957). Marcas de epítipo preferidas incluyen marcas poliHis, marcas HA y marcas myc y, preferiblemente, cada cadena está fusionada con un marcador diferente.

En la estructura realizada sobre la construcción del vector especialmente preferido ejemplificado en este documento, en donde el polipéptido multi-cadena es un fragmento Fab de una inmunoglobulina, el primer polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica un anclaje Aga2p, en fase con un segmento que codifica las regiones V_H y C_H^1 de una cadena pesada de Ig, y en fase con un segmento que codifica un marcador myc, en donde la región de la cadena pesada de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (por ejemplo, SfiI y NotI); y el segundo polinucleótido comprende una secuencia señal Aga2p en fase con un segmento que codifica un marcador HA, y en fase con un segmento que codifica una cadena ligera de Ig, en donde la región de la cadena ligera de Ig está rodeada por sitios de restricción únicos (por ejemplo, ApaI y AscI).

Presentación en una célula eucariota de un polipéptido multi-cadena

Mediante el uso del vector descrito y mostrado en este documento, se pone de manifiesto por primera vez un procedimiento para presentar un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota. El procedimiento para presentar un polipéptido multi-cadena en la superficie de una célula hospedadora eucariota comprende introducir el vector (posiblemente, en forma de un conjunto de vectores) en una célula eucariota (es decir, una célula hospedadora), y cultivar la célula hospedadora en condiciones apropiadas para la expresión, transporte y asociación de las cadenas del polipéptido multi-cadena con la superficie de la célula hospedadora, de manera que en la superficie de dicha célula hospedadora se muestra la actividad biológica del polipéptido multi-cadena.

La forma de introducir el vector de la presente invención en una célula hospedadora no es limitante para la presente invención e incluye cualquier método para introducir material genético en la célula ya conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin estar limitados a ellos, métodos conocidos y a los que se hace referencia en la técnica como transfección, transformación, electroporación, transferencia mediada por liposomas, transferencia biolística, conjugación, fusión celular y microinyección nuclear. Los métodos de transformación son conocidos en la técnica y son los preferidos para la transferencia genética.

Células hospedadoras (y pares de células hospedadoras) de presentación de polipéptidos multi-cadena

Los vectores de la presente invención son funcionales en una célula hospedadora eucariota para producir la expresión y presentar un polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula hospedadora eucariota. Opcionalmente, y particularmente en el caso de vectores de presentación dual, los vectores de la presente invención son funcionales también en una célula hospedadora procariota para producir la expresión en una célula hospedadora bacteriana y presentar un polipéptido multi-cadena en la superficie de un bacteriófago. La célula hospedadora eucariota puede ser cualquier célula eucariota de cualquier genotipo, diferenciada o sin diferenciar, unicelular o multicelular, dependiendo del interés del especialista y de los requisitos. Células eucariotas especialmente útiles incluyen células de mamífero, células vegetales, células fúngicas y células de protistas. Preferiblemente, la célula hospedadora es un organismo no diferenciado, unicelular y haploide o diploide. Los hongos son células hospedadoras preferidas, sobre todo las especies del filo *Ascomycota* (ascomicetos), debido a su facilidad y diversidad de condiciones de cultivo, la diversidad de mutantes bioquímicos y celulares disponibles, su escaso período de generación y su ciclo de vida (véase más abajo). Células hospedadoras fúngicas preferidas son las de los géneros *Neurospora* y las diversas levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Debaryomyces* y *Candida*. La especie muy particularmente preferida es *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan), tal vez el sistema de célula eucariota mejor conocido, caracterizado y utilizado en la investigación de biología molecular.

En realizaciones particulares, las células hospedadoras eucariotas son adecuadas para la fusión celular (véase más adelante). Por ejemplo, células de levadura de tipos de apareamiento opuestos pueden ser "apareadas" para producir células diploides fusionadas. Además, los protoplastos o esferoplastos de levadura apropiados para la fusión celular son también células hospedadoras eucariotas adecuadas a los efectos de la invención. De manera alternativa, las células que crecen en cultivo (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, etc.) se pueden fusionar por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un virus Sendai o corriente eléctrica).

Sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota

Los avances técnicos de la presente invención para presentar polipéptidos multi-cadena complejos en la superficie de una célula hospedadora eucariota se pueden combinar con el poder de la tecnología de presentación en fagos. Por ejemplo, utilizando un sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota, tal como se describe en este documento, los especialistas pueden combinar, por primera vez, la enorme diversidad proporcionada por las bibliotecas de presentación en fago y de la tecnología de presentación en fagos con la expresión, procesamiento, ensamblaje y expresión celulares que ofrece la tecnología de presentación eucariota multi-cadena anteriormente mencionada. La transferencia de información de una secuencia de ácido nucleico entre un vector de presentación en fago y el vector eucariota de la presente invención se puede conseguir por medio de diversos métodos de transferencia genética conocidos en la técnica (por ejemplo, tecnología de ingeniería genética tal como la tecnología de ADN recombinante). Formas preferidas de transferencia incluyen técnicas de digestión de restricción, amplificación por PCR, o recombinación homóloga.

En una realización, se emplea un vector lanzadera de presentación eucariota/procariota multi-cadena, tal como se ha descrito y mostrado en este documento. Los elementos de control genético del vector de presentación dual de la presente invención determinan, en una célula eucariota, la expresión, procesamiento, ensamblaje y presentación de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en la superficie de la célula eucariota transformada con el vector de presentación dual, a la vez que, en la célula hospedadora procariota, determinan la expresión, procesamiento, ensamblaje y presentación de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en la superficie de un bacteriófago infectado en la célula hospedadora procariota.

En otra realización, el sistema de transferencia presentación en fagos-presentación eucariota se lleva a cabo mediante la inserción de segmentos polinucleotídicos codificadores de cadena escindidos de un vector de presentación en fagos convencional (es decir, un bacteriófago tratado para presentar un polipéptido exógeno en la superficie de la partícula del fago), conocida en la técnica, en el vector de presentación eucariota multi-cadena de la presente invención, permitiendo de este modo la expresión de los segmentos codificadores de cadena, y el procesamiento, ensamblaje y presentación eucariotas de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota transformada con el vector de presentación eucariota. Tal como se ha descrito anteriormente, la transferencia de las secuencias polinucleotídicas desde un vector de presentación en fagos a un vector de presentación eucariota multi-cadena se puede lograr por cualquier método de ingeniería genética conocido en la técnica. Dos métodos especialmente preferidos incluyen un método de transferencia de escisión/inserción única y un método de transferencia de escisión/inserción múltiple (o modular).

En un proceso de transferencia con escisión/inserción única, los segmentos polinucleotídicos que codifican las cadenas de un polipéptido multi-cadena se escinden (por ejemplo, por digestión de restricción) del vector de presentación en fago en forma de un único aminoácido unitario y, subsiguientemente, se inserta en el vector de presentación multi-cadena. Una vez insertado en el vector de presentación eucariota, los elementos de control genético procariotas no deseados (si hay alguno), situados entre los polinucleótidos codificadores de cadena, son sustituidos por elementos de control genético eucariotas. Este proceso se representa en forma de diagrama en la Fig. 1 para un polipéptido multi-cadena de Fab de Ig, transferido desde un vector de presentación en fago a un vector de presentación en levadura multi-cadena especialmente preferido de la presente invención.

De manera alternativa, se escinden individualmente desde un vector de presentación en fagos segmentos polinucleotídicos que codifican cadenas de un polipéptido multi-cadena y, subsiguientemente, se insertan en el vector de presentación multi-cadena de forma separada e independiente. Este método ofrece un mayor control y flexibilidad con respecto a la transferencia de cadenas individuales de un polipéptido multi-cadena, por separado o de modo masivo. De hecho, dependiendo de los intereses y necesidades del especialista, sólo es necesario transferir cadenas seleccionadas del polipéptido multi-cadena. Este procedimiento aparece representado como diagrama para un polipéptido multi-cadena de Fab de Ig en la Fig. 2.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota que se describe y muestra en este documento es igualmente funcional tanto si se transfiere información de secuencias desde un vector de presentación en fagos a un vector de presentación eucariota multi-cadena, como desde un vector de presentación eucariota multi-cadena a un vector de presentación en fagos; es decir, el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota de la presente invención es efectivamente bidireccional. Una biblioteca de presentación en fagos especialmente preferida para utilizar en el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota según la invención es una gran biblioteca de fragmentos Fab humanos (de Haard, H. *et al.*, 1999).

Bibliotecas de presentación eucariota multi-cadena y su protocolo de exploración

Los vectores de presentación eucariotas multi-cadena de la presente invención, y las células hospedadoras transformadas con estos vectores, de manera que en la superficie de la célula hospedadora se muestra un polipéptido multi-cadena biológicamente activo, son de utilidad para la producción de bibliotecas de presentación. Por su parte, estas bibliotecas de presentación son útiles para explorar una diversidad de actividades biológicas de interés para el especialista, por ejemplo, la exploración frente a cualquiera de una serie de moléculas diana para identificar polipéptidos que se unen específicamente a esa diana.

Existen diversos métodos para expresar una serie variable de moléculas en la superficie de una célula hospedadora o fago. Las bibliotecas de presentación en fagos, y su exploración, representan una herramienta importante en investigación y desarrollo. Los métodos para producir y explorar bibliotecas de presentación en fagos son bien conocidos y utilizados en la técnica (Hoogenboom, H. *et al.*, 1997; Kay *et al.*, 1996; Ladner, R. *et al.*, 1993).

Los vectores de presentación eucariotas y multi-cadena de la presente invención se pueden usar para generar nuevas bibliotecas peptídicas *de novo*, similares a las bibliotecas de presentación en fago conocidas. Sin embargo, los vectores descritos en este documento permiten una expresión más eficaz de polipéptidos multi-cadena adecuadamente plegados, ensamblados, glicosilados y presentados, tal como se puede lograr únicamente en un sistema eucariota. Estas bibliotecas de presentación eucariotas multi-cadena se pueden utilizar, entonces, en ensayos de exploración. Las personas con cierta experiencia en la técnica podrán apreciar y adaptarán con facilidad los protocolos de exploración de bibliotecas de presentación conocidos en la técnica (por ejemplo, ensayos de exploración de presentación en fagos) a las bibliotecas de presentación eucariotas multi-cadena de la presente invención.

Además de generar nuevas bibliotecas de presentación eucariotas multi-cadena *de novo*, la presente invención permite además al especialista transferir bibliotecas de presentación en fago ya existentes al sistema de presentación eucariota multi-cadena que se describe y muestra en este documento. De manera particular, el sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota permite construir una biblioteca de presentación en fagos para la expresión de un repertorio muy amplio de polipéptidos multi-cadena; por ejemplo, Fab, que tienen componentes de cadena ligera y de cadena pesada. La biblioteca de presentación en fagos, que pueden tener una diversidad de $>1 \times 10^8$ (prefe-

blemente, $>1 \times 10^9$, más preferiblemente, $>1 \times 10^{10}$) polipéptidos multi-cadena en una biblioteca, puede someterse a un exploración inicial, produciendo una sub-población de menos de aproximadamente 1×10^7 (preferiblemente, entre 1×10^5 y 1×10^6) aislados de presentación en fagos. Los polinucleótidos que codifican las cadenas de los aislados de polipéptidos multi-cadena pueden ser transferidos, seguidamente, de manera discontinua a un vector de presentación eucariota multi-cadena de la presente invención para la transformación en un hospedador eucariota. Los polipéptidos multi-cadena presentados en células hospedadoras eucariotas se pueden explorar y manipular adicionalmente, aprovechando las condiciones de cultivo y las calidades de expresión del sistema de presentación eucariota, tal como se ha analizado anteriormente (por ejemplo, plegado de proteínas, asociación apropiada de cadenas separadas en la proteína multi-cadena, glicosilación, secreción y modificaciones post-traducción tales como ligaduras de fosfatidil inositol con la membrana celular). Además, una vez insertada en el vector de presentación eucariota multi-cadena, la biblioteca de presentación de polipéptidos multi-cadena (o aislados pre-seleccionados de la misma) se pueden diversificar de forma adicional (por ejemplo, recombinación de cadenas polipeptídicas, re-distribución o re-mezcladura) para ciclos adicionales de exploración.

En una realización especialmente preferida, se proporciona un vector de presentación en fago M13 que tiene:

un sitio de clonación de cadena ligera de Ig, definido por un sitio de restricción ApaLI y un sitio de restricción AscI, y que muestra una orientación 3' hacia una secuencia señal (por ejemplo, una secuencia señal pIII), y bajo el control de transcripción de un promotor LacZ; y un sitio de clonación de un fragmento de cadena pesada, definido por un sitio de restricción SfiI y un sitio de restricción NotI, y que tiene una orientación 3' hacia una secuencia señal (por ejemplo, una secuencia señal pIII), bajo el control de transcripción de un promotor LacZ, y en orientación 5' hacia un pIII maduro o una porción de anclaje de pIII (tocón) que codifica la secuencia.

El vector de presentación eucariota multi-cadena en esta realización preferida es un vector de levadura, que tiene:

un sitio de clonación de cadena ligera de Ig, definido por un sitio de restricción ApaLI y un sitio de restricción AscI, y que muestra una orientación 3' con respecto a una señal de secreción Aga2p y bajo el control de transcripción de un promotor GAL (preferiblemente, GAL1 o GAL1-10);

y

un sitio de clonación de un fragmento de cadena pesada de Ig, definido por un sitio de restricción SfiI y un sitio de restricción NotI, y que muestra una orientación 3' con respecto a una señal de secreción Aga2p, bajo el control de transcripción de un promotor GAL (preferiblemente, GAL o GALA1-10), y una orientación 3' con respecto a una secuencia que codifica Aga2p maduro.

El vector de presentación en levadura se usa para transformar una célula hospedadora de levadura para expresar anticuerpos o fragmentos Fab presentados en la superficie de la célula de levadura. Las secuencias codificadoras de cadena ligera y pesada se escinden de forma individual (por digestión ApaLI/AscI y digestión SfiI/NotI, respectivamente) o conjunta (por digestión ApaLI/NotI) a partir del vector de presentación en fagos, y se insertan en el vector de presentación en levadura multi-cadena por transferencia discontinua, dando una multiplicidad de apareamientos de cadenas LC/HC para su expresión y presentación en la levadura. Un vector de presentación en levadura especialmente preferido para la presentación en levadura de Fab es pTQ3 (descrito más adelante). Una presentación en fago particularmente preferida es una extensa biblioteca de fragmentos Fab humanos (de Haard, H. *et al.*, 1999).

El especialista en la técnica podrá apreciar que los métodos anteriores son útiles para identificar y aislar polipéptidos multi-cadena que poseen una diversidad de características detectables (por ejemplo, actividad catalítica, interacciones peptídicas, estabilidad térmica, niveles deseables de expresión), o cualquier otra mejora que sea seleccionable por medio de la expresión en superficie de un polipéptido multi-cadena presentado.

Adicionalmente, se podrá ver que la presente invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo útiles para la inmunopurificación, inmunoensayos, marcaje citoquímico, y métodos de establecimiento de dianas, y métodos de diagnóstico o terapia. Por ejemplo, el anticuerpo o su fragmento se pueden unir a una proteína terapéuticamente activa tal como un interferón o un factor de coagulación sanguínea tal como, por ejemplo, Factor VIII y, por lo tanto, se puede usar para producir un medio para cromatografía de afinidad para utilizar en inmunopurificación o en el ensayo de la proteína.

Presentación de un polipéptido multi-cadena como producto de fusión celular

El ciclo vital básico de las células eucariotas comprende la alternancia entre los estados diploide (dos copias de los cromosomas o genoma del organismo por célula) y haploide (una copia de los cromosomas o genoma del organismo por célula). La alternancia entre estos dos estados se consigue por la fusión de dos células haploides (típicamente, pero no necesariamente, la fertilización de tipos de apareamiento opuestos) para formar una única cé-

lula diploide, y división meiótica de una célula diploide para formar múltiples células haploides (hijas). Los biólogos consideran que este ciclo vital básico (es decir, la alternancia de generaciones haploides y diploides) representa un mecanismo natural importante para la recombinación biológica de información genética (es decir, reproducción sexual).

En la mayor parte de los animales, el estado diploide es el estadio dominante del ciclo vital, generado por la fusión de dos células haploides (normalmente denominadas gametos) de tipo de apareamiento opuesto: un espermatozoide y un óvulo. La división celular meiótica de células diploides (gametogénesis) produce el estado de célula haploide para la reproducción sexual.

El patrón del ciclo vital del reino vegetal ofrece una alternancia más general de generación, en donde los estados haploide y diploide pueden existir como generaciones más distintas, dependiendo de la especie particular de la planta. En plantas “inferiores” (es decir, más primitivas), predomina la generación de la célula haploide (el “gametofito”) (por ejemplo, musgos, plantas hepáticas y hornabeque); mientras que en las plantas “superiores” (es decir, más evolucionadas), predomina la generación de la célula diploide (el “esporofito”) (por ejemplo, helechos, coníferas y plantas con flor).

Para muchos hongos y protistas, predomina el estadio haploide en el ciclo vital. La fertilización produce un estadio diploide que a menudo y prácticamente de inmediato (dependiendo de las condiciones ambientales) sufre una meiosis para formar células haploides. De manera importante, e independientemente del género del organismo analizado o del estadio que predomina en el ciclo vital del mismo, la recombinación natural y la re-mezcla de material genético resultantes de la meiosis de células diploides para producir células haploides, y la fusión celular de células haploides separadas para formar una célula diploide (con una nueva dotación genética) es un procedimiento potente que se puede utilizar en la investigación biológica. Descrito y explicado por primera vez en este documento, este potente mecanismo se utiliza en la investigación de proteínas de combinación para la generación de bibliotecas de presentación de péptidos multi-cadena únicos.

En un aspecto adicional de la presente invención, la forma de introducir vectores de presentación multi-cadena eucariotas en una célula hospedadora incluye la fusión de dos células eucariotas, preferiblemente haploides, cada una de las cuales expresa al menos una de las cadenas del polipéptido multi-cadena, de manera que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula hospedadora resultante, preferiblemente diploide. Por ejemplo, cada una de las dos células haploides puede contener uno de los vectores de un conjunto de vectores (tal como se ha descrito en este documento), de modo que una vez combinadas (por ejemplo, por fusión celular de células hospedadoras) y co-expresadas en la célula hospedadora diploide resultante, se muestra la actividad biológica del polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula hospedadora. Estos métodos se pueden usar para preparar nuevas bibliotecas polipeptídicas multi-cadena como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, bibliotecas de presentación de anticuerpos o Fab, incluidas células hospedadoras diploides que muestran polipéptidos multi-cadena que poseen una diversidad mayor que el repertorio fuente).

De forma alternativa, se pueden construir poblaciones de un conjunto de vectores compatibles de modo que una población de vectores de presentación eucariotas exprese múltiples (por ejemplo, un repertorio o biblioteca) formas de una cadena ligera de Fab de Ig (que comprende los dominios V_L y C_L), y una segunda población de vectores de presentación eucariotas exprese múltiples formas de una cadena pesada de Fab de Ig (que comprende los dominios V_H y C_H^1) fusionada con una proteína de anclaje de levadura (por ejemplo, Aga2p). Cada una de las poblaciones de vectores se utiliza para transformar células haploides de levadura de tipo de apareamiento opuesto; una construcción de vector en un tipo de apareamiento, y una segunda construcción de vector en el tipo de apareamiento opuesto. Se co-cultivan las dos poblaciones de levaduras haploides en condiciones suficientes para inducir el apareamiento de levaduras (es decir, fusión celular) de los dos tipos de apareamiento. Las células hospedadoras de levadura diploides resultantes de la población poseen ambas construcciones de vector y expresan y muestran el Fab de Ig completamente formado y ensamblado.

Aunque, tal como se ha analizado anteriormente, en la presente invención se puede utilizar cualquier célula eucariota capaz de una fusión celular. La fusión celular puede tener lugar de forma sexual por apareamiento, o artificial, por ejemplo, en cultivos de tejido u otras condiciones artificiales. En el caso de una fusión celular sexual, resulta apropiada cualquier célula eucariota con la condición de que pueda existir (sin importar la duración) en estado tanto haploide como diploide. Para la fusión celular artificial, las células no están limitadas por la ploidía, como lo estarían en caso de la fusión sexual. Por ejemplo, se puede inducir la fusión de células diploides de mamífero mantenidas en cultivos de tejidos, dando lugar así a células hospedadoras tetraploides. Para la presente invención, la ploidía real de las células hospedadoras que se deben fusionar no supone ninguna limitación, mientras las células se puedan fusionar. Las características importantes de las células son que un miembro celular contenga un vector o conjunto de vectores que comprenda una cadena particular de un polipéptido multi-cadena y un marcador específico seleccionable, y que el miembro célula hospedadora contenga un vector o un conjunto de vectores que comprenda una segunda cadena de un polipéptido multi-cadena y un marcador seleccionable. Cuando se fusionan las células, por lo tanto, la célula fusionada resultante contiene vectores que codifican dos o más cadenas de un polipéptido multi-cadena en una célula que se identifica con facilidad por medio de los marcadores seleccionables.

Los hongos y, particularmente, los ascomicetos (por ejemplo, *Neurospora* y levaduras), son células hospedadoras eucariotas particularmente preferidas. Los ascomicetos reciben este nombre porque producen los productos de esporas haploides de la meiosis en asci microscópicos, lo que permite su recolección, segregación, análisis y manipulación sencillas (se destaca particularmente *Neurospora* debido a que el tamaño y forma de su ascus conserva el orden de los productos celulares haploides de la meiosis). Igualmente, estos hongos, sobre todo *S. cerevisiae*, existen de forma estable en forma tanto haploide como diploide, en donde cualquiera de ellos se induce y conserva fácilmente (por ejemplo, el estado haploide de una levadura se induce y mantiene típicamente bajo alguna forma de estrés nutricional, es decir, privación). Por último, en muchos hongos (también en levaduras especialmente preferidas) las células haploides existen como dos sexos (los tipos de apareamiento α y α), a partir de los cuales se fusionan sólo los tipos de apareamiento opuesto para formar el estado diploide. En condiciones manipulables en laboratorio por un especialista en la técnica, una célula α se fusionará con una célula a , creando de este modo una célula diploide fusionada.

Como se ha señalado anteriormente, en la técnica se conocen métodos artificiales para fusionar células. Por lo tanto, la presente invención es adecuada para células eucariotas tales como, por ejemplo, células de mamífero, insecto o vegetales que crecen en cultivos. Adicionalmente, es posible manipular protoplastos o esferoplastos de levadura para producir la fusión celular incluso si son del mismo tipo de apareamiento. Estos métodos artificiales de fusión celular son conocidos en la técnica y resultan apropiados a los efectos de la presente invención.

Por último, los especialistas con experiencia en la técnica reconocerán y apreciarán que los productos y métodos descritos y mostrados en este documento no están limitados por una célula hospedadora eucariota de una ploidía particular. De hecho, se pueden utilizar otros organismos poliploides (por ejemplo, formas triploides y tetraploides más extrañas) sobre todo como hospedadores para conjuntos de vectores que expresan polipéptidos multi-cadena de orden superior (por ejemplo, de tres y cuatro cadenas, respectivamente).

Exploración de polipéptidos multi-cadena usando una fusión celular eucariota

Las bibliotecas de polipéptidos multi-cadena presentadas en células hospedadoras eucariotas se pueden explorar y manipular por procedimientos y métodos similares conocidos en la técnica, por ejemplo, exploración de biblioteca de presentación en fago, pero permiten también al especialista beneficiarse de las condiciones de cultivo y calidades de expresión de un sistema hospedador eucariota. Como se ha señalado anteriormente, la exploración de presentación eucariota se puede prologar con un ciclo inicial de exploración de presentación en fagos antes de transferir la biblioteca de presentación desde el vector de presentación en fagos a un vector de presentación eucariota multi-cadena. Una vez insertada en el vector de presentación eucariota multi-cadena, la biblioteca de polipéptidos multi-cadena (o aislados preseleccionados de la misma) se puede someter a uno o múltiples ciclos de exploración bajo el sistema de presentación eucariota.

Como una realización adicional de los métodos de exploración de la presente invención, y de manera exclusiva para los métodos de la presente invención, las bibliotecas de presentación eucariotas multi-cadena se pueden someter a una diversificación adicional (parcial u objetiva) subsiguiente a cualquier ensayo de exploración que utilice la alternancia de generaciones característica de los sistemas eucariotas, tal como se ha analizado anteriormente. En poblaciones de células hospedadoras eucariotas diploides, que contienen un vector de presentación multi-cadena, en donde diferentes cadenas de la multi-cadena se expresan a partir de diferentes vectores (por ejemplo, cuando la célula hospedadora diploide es el producto del apareamiento de haploides o de la fusión celular, como se ha descrito anteriormente) es posible inducir su sometimiento a una meiosis (por ejemplo, esporulación en levaduras). Las células haploides de levadura (esporas) se pueden segregar y/o seleccionar dependiendo de las condiciones de exploración, con el fin de aislar diferentes vectores de presentación con una propiedad preferida en células hijas haploides. A continuación, las células hijas pueden ser, opcionalmente:

sometidas a mutagénesis (variegación) *in vitro* (por ejemplo, manipulación de ADN aislado) o *in vivo* (por ejemplo, luz UV) para proporcionar una multiplicidad de homólogos de las cadenas preseleccionadas. Cuando se expresan y presentan estas cadenas homólogas, es posible seleccionar polipéptidos multi-cadena homólogos que muestran mayor afinidad por la misma molécula diana; o

fusionadas nuevamente con otras células hospedadoras hijas, recombinando de este modo cadenas preseleccionadas individuales de los aislados de polipéptidos multi-cadena entre sí; o

fusionarlas con la población de células hospedadoras de la biblioteca multi-cadena inicial, y de esta forma se produce la recombinación de cadenas preseleccionadas de los aislados de polipéptidos multi-cadena con la fuente original de la variante multi-cadena; o

fusionarlas con una nueva población de células hospedadoras de biblioteca multi-cadena; de este modo, se combinan las cadenas preseleccionadas de los aislados de polipéptidos multi-cadena con una nueva fuente de variabilidad multi-cadena; o

cualquier combinación de cualquiera de las etapas anteriores, según sea apropiado.

Una vez completada esta recombinación, re-distribución o re-mezcladura de cadenas preseleccionadas de una exploración de polipéptidos multi-cadena entre sí o con otra fuente de diversidad multi-cadena, la nueva población de la biblioteca de mezcla se puede someter a ciclos adicionales de exploración nuevo o repetido.

La presente invención hace referencia a técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular. Estas técnicas incluyen, pero sin limitación, técnicas descritas en las siguientes publicaciones:

Ausubel, F. *et al.*, eds., Short Protocols In Molecular Biology (4^a Ed., 1999) John Wiley & Sons, NY, NY. (ISBN 0-471-32938-X).

Fink and Guthrie, eds., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (1991) Academic Press, Boston, MA. (ISBN 0-12-182095-5).

Kay *et al.*, Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (1996) Academic Press, San Diego, CA.

Kabat, E. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (5^a Ed., 1991) U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD.

Lu and Weiner, eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysts (2001) BioTechniques Press, Westborough, MA. (ISBN 1-881299-21-X).

Old, R. and Primrose, S., Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3^a Ed. 1985).

Blackwell Scientific Publications, Boston, MA. Studies in Microbiology; V.2:409 (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook, J. *et al.*, eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, NY. Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6).

Winnacker, E., From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY, NY (translated by Horst Ibelgauf). (ISBN 0-89573-614-4).

Referencias

Boder, E. and Wittrup, K. 1998. Biotechnol. Prog., 14:55-62.

Chang, H. *et al.*, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11408-12.

Cramer, R. and Blaser, K., 1996. Int. Arch. Allergy Immunol., 110:41-45.

Cramer, R. and Suter, M., 1993. Gene, 137:69-75.

de Haard, H. *et al.*, 1999. J. Biol. Chem., 274:18218-18230.

Fields, S. and Sternglanz, R., 1994. Trends Genet., 10:286-292.

Gietz, D. *et al.*, 1992. Nucleic Acids Res., 20:1425.

Hoogenboom, H. *et al.*, 1997. Trends Biotechnol., 15:62-70.

Horwitz, A. *et al.*, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8678-8682.

Kieke, M. *et al.*, 1997. Protein Eng., 10:1303-1310.

Kieke, M. *et al.*, 1999. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:5651-5656.

Ladner, R. *et al.*, 1993, U.S. Pat No. 5,223,409.

Liu, Q. *et al.*, 2000. Methods Enzymol., 328:530-549.

Moll, J. *et al.*, 2001. Protein Sci., 10:649-55.

Munro, S. and Pelham, H., 1987. Cell, 48:899.

Phizicky, E. and Fields, S., 1995. Microbiol. Rev., 59:94-123.

Pu, W. and Struhl, K., 1993. *Nucleic Acids Res.*, 21:4348-55.

Walhout, A. et al., 2000. *Methods Enzymol.*, 328:575-593.

Wittrup et al., WO 99/36569.

Esta invención se ilustra adicionalmente por medio de los ejemplos siguientes, que no deben ser considerados limitantes de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de un Vector de presentación eucariota Multi-cadena; pTQ3

Los materiales y técnicas descritos anteriormente se utilizaron para construir un vector de presentación eucariota multi-cadena; específicamente, un vector de presentación en levadura eficaz en una célula hospedadora de levadura transformada con el vector. El vector es útil para expresar, transportar, ensamblar y presentar un polipéptido multi-cadena biológicamente activo (por ejemplo, un Fab de Ig) en la superficie de una célula hospedadora de levadura.

En este ejemplo, se utilizó un vector disponible en el mercado, pYD1 (In Vitrogen, Carlsbad, CA), un vector de presentación de 5,0 kb diseñado para la expresión, secreción y presentación de una proteína de una sola cadena en la superficie de células de *S. cerevisiae*, como plantilla del vector de presentación eucariota de partida. pYD1 incluye: un gen Aga2p que codifica una de las subunidades del receptor de α -aglutinina; un promotor GAL1 para la expresión regulada de una fusión de Aga2p/polipéptido; un marcador de epítipo HA para la detección de la proteína presentada; un marcador de poli-histidina (6xHis) para la purificación sobre resina quelante de metal; un CEN6/ARS4 para la replicación episomal estable en levadura; y un gen *TrpI* para la selección de transformantes de *S. cerevisiae*, un gen de resistencia a ampicilina (ampR) y el origen pMB1 para la selección y replicación en *E. coli*.

El plásmido pYD1 se modificó para la expresión de una cadena ligera de Ig y un fragmento de una cadena pesada a partir de dos promotores tándem inducibles por galactosa, para la presentación de un fragmento de anticuerpo Fab intacto. Un promotor *GAL1* dirige la expresión de la cadena ligera y el otro promotor *GAL1* dirige la expresión del fragmento de cadena pesada fusionado con el extremo C-terminal de la proteína de anclaje de levadura Aga2p.

Al objeto de transferir efectivamente las cadenas de un polipéptido multi-cadena al vector de presentación, se generaron sitios de restricción únicos como parte de la construcción del vector. Las secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción (es decir, sitios de restricción) seleccionadas para esta construcción de vector incluyeron *ApaLI*, *AscI*, *SfiI* y *NotI* como sitios de clonación únicos para las cadenas de un polipéptido bicatenario (en este caso, un Fab de Ig), y *NheI* para facilitar las transferencias de presentación en fago-presentación eucariota con las bibliotecas de presentación en fago existentes.

Se llevaron a cabo varias modificaciones de la secuencia del vector para asegurar el uso eficaz de *ApaLI* con un único sitio de restricción. Los sitios *ApaLI* situados en el plásmido pYD1 (como lo suministra InVitrogen), a partir de las posiciones 1393, 3047 y 4293, se retiraron por mutagénesis dirigida (usando QUICKCHANGE, Stratagene, La Jolla, CA) como se indica a continuación:

posición de pYD1	cambio de nucleótido <i>ApaLI</i>
1393	GTGCAC a GTGCAG
3047	GTGCAC a GTGCTC
4293	GTGCAC a GAGCAC

El sitio *ApaLI* que se inicia en la posición 3047 se encuentra dentro del *ampR*, y requiere una mutación silenciosa para no modificar la secuencia codificadora de aminoácidos de este gen.

ES 2 327 905 T3

Con el fin de hacer que la construcción del vector de presentación en levadura multi-cadena sea compatible con otros vectores de presentación en fago preexistentes en la técnica (Dyax Corp., Cambridge, MA), se introdujo un único sitio de restricción en la secuencia señal *aga2p* del vector pYD1 sin alterar la secuencia codificante, usando técnicas de mutagénesis por PCR dirigida al sitio, conocidas en la técnica. Específicamente, se creó un sitio *NheI* a través del codón de serina terminal de la secuencia señal *aga2p* mediante la sustitución del codón TCA con un codón AGC.

El vector modificado de este modo, que tiene un sitio *ApaLI* en posición 3' inmediatamente adyacente al promotor *GALI*-secuencia señal *aga2p*-segmentos de marcador HA preexistente, seguido por un sitio *AscI* y un sitio *NheI* incorporado en la secuencia señal *aga2p*, se designó pTQ2.

Se utilizaron procedimientos de ensamblaje por PCR conocidos en la técnica para construir un poli-enlazador compatible con las bibliotecas de presentación en fago existentes para la escisión/inserción de genes estructurales para el componente de cadena ligera del Fab en el vector de presentación en levadura multi-cadena. El segmento del vector de presentación eucariota multi-cadena intermedio resultante, que se extiende desde la secuencia señal *aga2p* hasta el sitio poli-enlazador diseñado es como se indica a continuación (* indica codones de detención):

NheI

ATG CAG TTA CTT CGC TGT TTT TCA ATA TTT TCT GTT ATT GCT AGC GTT

M O L L R C F S I F S V I A S V

Secuencia señal de Aga2p

ApaLI

TTA GCA TAC CCA TAC GAC GTT CCA GAC TAC GCT AGT GCA CAG GAT

L A Y P Y D V P D Y A S A Q D

marcador de epitopo de HA

AscI

BamHI

PstI

TTC GTG CAA TGC GGC GCG CCA GGA TCC GCC TGA ATG GTC TGC AGA

F V Q C G A P G S A * M V C R

EcoRI

PacI

CCG TAC CGA CCG AAT TCG AGT TAC CTG AGG TTA ATT AAC ACT GTT

P Y R P N S S Y L R L I N T V

PmeI

ATC GTT TAA ACG TTC AGG TGC AA (SEC ID N°: 1)

IV * T F R C (SEC ID N°: 2)

ES 2 327 905 T3

Se amplificó por PCR una secuencia de terminación de la transcripción MAT α a partir del plásmido pYD1, y se incorporaron sitios de restricción *Bam*-HI y *Pst*I para facilitar la clonación en el plásmido pTQ2 anterior. Seguidamente, el terminador MAT α se digirió con *Bam*HI y *Pst*I, y se insertó en el sitio *Bam*HI/*Pst*I en el plásmido pTQ2.

A partir del plásmido pYD1 se amplificó una construcción de ADN que incluyó (5'-3'); el promotor *GALI*, la secuencia señal *aga2p*, la secuencia codificadora de la proteína Aga2p y un enlazador de glicina/serina. Se agregaron un segmento enlazador de ADN que contuvo los sitios de restricción *Sfi*I y *Not*I y un segmento que codificó un marcador myc en el extremo 3' del segmento pYD1 amplificado. El marcador myc se incluyó para permitir la detección de la cadena anclada (del polipéptido multi-cadena) en la superficie de la célula de levadura. Las secuencias del segmento de enlazador-myc son las siguientes:

GGA GGC GGA GGT TCT GGG GGC GGA GGA TCT GGT GGC GGA GGT TCT

G G G G S G G G G S G G G G S

*Sfi*I

*Not*I

GCG GCC CAG CCG GCC AGT CCT GAT GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC

G G Q P G S P D A A A E Q K L

*Pac*I

ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT TTA ATTA (SEC ID N°: 3)

I S E E D L N (SEC ID N°: 4)

Este segmento de enlazador-myc se insertó en un pTQ2 digerido con *Eco*RI y *Pac*I. El plásmido resultante, con sitios de clonación únicos para la inserción/escisión de las cadenas de un polipéptido multi-cadena (específicamente, cadena ligera y fragmentos de la cadena pesada de un Fab) se designó pTQ3 (fig. 3). El plásmido pTQ3 es un plásmido de expresión en levadura multi-cadena de 5810 pb que comprende, en parte pertinente, la siguiente secuencia de vector:

←-----secuencia de señal de Aga2p-----→

435 ATG CAG TTA CTT CGC TGT TTT TCA ATA TTT TCT GTT ATT GCT

M Q L L R C F S I F S V I A

5 -----> <----- marcador de HA----->

AGC GTT TTA GCA TAC CCA TAC GAC GTT CCA GAC TAC GCT

10 S V L A Y P Y D V P D Y A

*Apa*LI *Asc*I *Bam*HI

15 AGT GCA CAG GAT TTC GTG CAA TGC GGC GCG CCA GGA TCC

S A Q D F V Q C G A P G S

20

ATG TAA

25 M (SEC ID Nº: 6)

30 <----- terminador Mat α ----->

661 CAAAATCGACTTTGTTCCCACTGTACTTTTAGCTCGTACAAAATACAATATACTTTTCAT

721 TTCTCCGTAAACAACATGTTTTCCCATGTAATATCCTTTCTATTTTCGTTCCGTTACC

35 781 AACTTTACACATACTTTATATAGCTATTCACTTCTATACACTAAAAAACTAAGACAATTT

841 TAATTTTGCTGCCCTGCCATATTCAATTTGTTATAAATTCCTATAATTTATCCTATTAGT

40 *Eco*RI

901 AGCTAAAAAAGATGAATGTGAATCGAATCTAAGAGAATTACGGATTAGAAGCCGCCG

45 <----- promotor de GAL1 ----->

961 AGCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTCG

1021 CGTTCCTGAAACGCAGATGTGCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAA

1081 TACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTC

1141 AAATGAACGAATCAAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTAT

50 1201 TTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGC

1261 AAAAAGTGCATTAACCACTTTAACTAATCTTTCAACATTTTCGTTTGTATTACTTCTT

1321 ATTCAAATGTATATAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTC

55 1381 AAGGAGAAAAAACCCGGATCGGACTACTAGCAGCTGTAATACGACTCACTATAGGGAATA

1441 ITAAGCTAATTTCTACTTCATACATTTTCAATTAAG

60 <----- secuencia de señal de Aga2p ----->

1476 ATG CAG TTA CTT CGC TGT TTT TCA ATA TTT TCT GTT ATT GCT TCA GTT TTA GCA

65

ES 2 327 905 T3

```

      M   Q   L   L   R   C   F   S   I   F   S   V   I   A   S   V   L   A
5      -----> <----- proteína de Aga2 madura -----
1530  CAG GAA CTG ACA ACT ATA TGC GAG CAA ATC CCC TCA CCA ACT TTA GAA TCG ACG
      Q   E   L   T   T   I   C   E   Q   I   P   S   P   T   L   E   S   T

10      -----
1584  CCG TAC TCT TTG TCA ACG ACT ACT ATT TTG GCC AAC GGG AAG GCA ATG CAA GGA
      P   Y   S   L   S   T   T   T   I   L   A   N   G   K   A   M   Q   G

15      -----
1638  GTT TTT GAA TAT TAC AAA TCA GTA ACG TTT GTC AGT AAT TGC GGT TCT CAC CCC
      V   F   E   Y   Y   K   S   V   T   F   V   S   N   C   G   S   H   P

20      -----
1692  TCA ACG ACT AGC AAA GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT GTT TTT
      S   T   T   S   K   G   S   P   I   N   T   Q   Y   V   F

25      ----->
      <----- enlazador Glicina-Serina ----->
1736  GGA GGC GGA GGT TCT GGG GGC GGA GGA TCT GGT GGC GGA GGT TCT
      G   G   G   G   S   G   G   G   G   S   G   G   G   G   S

30      -----
      SfiI                               NotI      <----- marcador myc -----
1782  GCG GCC CAG CCG GCC AGT CCT GAT GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA
      A   A   Q   P   A   S   P   T   A   A   A   E   Q   K   L   I   S   E

35      -----
      ----->   PacI                               PmeI
40      1836  GAG GAT CTG AAT TTA ATT AAC ACT GTT ATC GTT TAAAC      (SEC ID N°: 5)
      E   D   L   N   L   I   N   T   V   I   V      (SEC ID N°: 7)

```

45 Se llevaron a cabo modificaciones posteriores del vector anterior mediante la inserción de un marcador 6xHis para la purificación de anticuerpos Fab solubles y mediante la recolocación del codón de detención (TAA) en el extremo de el marcador myc, antes del sitio *PacI*, para eliminar aminoácidos superfluos. Otras modificaciones han incluido la eliminación de un sitio de restricción *XbaI* endógeno dentro del marcador selectivo Trp por mutagénesis dirigida. Esto se realizó para facilitar la clonación y la manipulación de los anticuerpos principales del conjunto de bibliotecas CJ

50 (Dyax Corporation, Cambridge, MA).

Ejemplo 2

55 *Presentación en fago-Transferencia Eucariota y Expresión en Células Hospedadoras Eucariotas de Polipéptidos Fab multi-cadena, Específicos para Estreptavidina, Mucina-1 y el Antígeno 4 Asociado a Linfocito-T Citotóxico*

Se transfirieron diferentes Fab de presentación en fago desde el vector de presentación en fago hasta un vector de presentación eucariota multi-cadena para demostrar la utilidad del sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota, y la capacidad del vector eucariota multi-cadena de la presente invención para expresar un polipéptido multi-cadena. A continuación, el vector se insertó en una célula hospedadora eucariota, y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para la expresión de los Fab.

60

Se clonaron anticuerpos Fab anti-estreptavidina, F2, A12 y 4C8 a partir de una extensa biblioteca de Fab humanos sin tratamiento previo (de Haard, H. *et al.*, 1999) en el vector de presentación en levadura multi-cadena pTQ3 construido en el Ejemplo 1, en forma de una cadena ligera ($V_L C_L$) y cadena pesada ($V_H C_H^1$) apareada. Adicionalmente, se clonó un anticuerpo Fab anti-mucina, PH1, a partir de la misma biblioteca de Fab en el vector de presentación

65

en levadura multi-cadena pTQ3, construido en el Ejemplo 1, en forma de una cadena ligera ($V_L C_L$) y cadena pesada ($V_H C_H$) apareada. Adicionalmente, se clonaron cuatro anticuerpos, E7, E8, A9, A11, específicos para el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) a partir de la misma biblioteca de Fab en el vector de presentación en levadura multi-cadena pTQ3 construido en el Ejemplo 1, en forma de una cadena ligera ($V_L C_L$) y cadena pesada ($V_H C_H$) apareada.

Las cadenas de los Fab se clonaron en el vector de presentación en levadura multi-cadena usando el procedimiento de transferencia de escisión/inserción único que se ha descrito anteriormente y se ilustra en la Fig. 1. El polinucleótido LC-HC de la biblioteca Fab se insertó como un único fragmento *Apa*LI/*Not*I. Los elementos de control genéticos procariotas no deseados que intervinieron en las regiones de codificación del fragmento LC y HC, y definidos por el fragmento de restricción *Asc*I/*Sfi*II de la biblioteca Fab se sustituyó con el fragmento *Asc*I/*Sfi*II derivado de pTQ3.

Los plásmidos resultantes, denominados pTQ3-F2, pTQ3-A12, pTQ3-4C8, pTQ3-PH1, pTQ3-E7, pTQ3-E8, pTQ3-A9 y pTQ3-A11, se transformaron por separado en una cepa de *S. cerevisiae* EBY100 (Invitrogen, Carlsbad, CA), según el método de Gietz, D. *et al.*, 1992. También se transformó EBY100 con pTQ3 que no contuvo ningún inserto multi-cadena a modo de control. La selección de transformantes se llevó a cabo seleccionando un marcador auxótrofo de triptófano para el vector (medio definido sintético menos triptófano, glucosa al 2% (peso/volumen), agar al 2% (SDCAA+GA)).

Los transformantes exitosos (denominados de manera correspondiente *EBY100 pTQ3-F2*, *EBY100 pTQ3-A12*, *EBY100 pTQ3-4C8*, *EBY100 pTQ3-PH1*, *EBY100 pTQ3-E7*, *EBY100 pTQ3-E8*, *EBY100 pTQ3-A9*, *EBY100 pTQ3-A11* y *EBY100 pTQ3* de control) se cultivaron durante una noche a 30°C con agitación en 10 ml de SDCAA+G. Se extrajeron de inmediato dos muestras de células cuando la DO_{600} alcanzó 1,0 (por ejemplo, 2 ml de un cultivo de DO_{600} de 1,0) para la preparación del lisado de proteína en el punto de inducción de tiempo igual a cero (T_0). Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron y las células de levadura aglomeradas se suspendieron nuevamente en 10 ml de SDCAA, 2% (peso/volumen) de galactosa hasta una DO_{600} de 1. Las células se cultivaron a 20°C para inducir la expresión del vector de las cadenas ligera y pesada durante 48 horas. Seguidamente, las células cultivadas se centrifugaron y lavaron dos veces en 1 ml de agua esterilizada, transfiriéndolas a un tubo de Eppendorf de centrifugación.

Los sedimentos celulares se suspendieron nuevamente en 250 ml de tampón SDS-PAGE más ditiotretitol (DTT); se agregaron perlas de vidrio de 425-600 micrómetros (Sigma, St. Louis, MO) hasta inmediatamente por debajo del menisco, y la suspensión se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto. La suspensión se mantuvo sobre hielo entre los procedimientos de vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se calentó a 100°C durante 5 minutos.

Se separaron muestras de proteína en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia de Western. La detección de los polipéptidos de cadena ligera se llevó a cabo usando un anticuerpo anti-HA (1 µg/ml) (Dako, Carpintería, CA). La detección del polipéptido de fusión de cadena pesada-Aga2p se efectuó usando un anticuerpo anti-c-Myc (1 µg/ml) junta con un anticuerpo anti-HRP de ratón secundario (Dako, Carpintería, CA). La inmunodetección se realizó por quimioluminiscencia reforzada (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Se detectaron el producto LC de aproximadamente 30 kD y el producto de fusión de HC-Aga2p de aproximadamente 45 kD de los Fab expresados (F2 y PH1; Figs. 4A y 4B). Antes de la inducción con galactosa (véanse las Figs. 4A y 4B) se detectó el producto LC o de la fusión de HC-Aga2p no detectable.

Ejemplo 3

Presentación Funcional en Superficie de un Polipéptido Multi-cadena en una Célula Hospedadora Eucariota

Como demostración de la capacidad del vector eucariota multi-cadena de la presente invención para expresar, ensamblar y presentar adecuadamente un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en la superficie de una célula hospedadora eucariota, se insertó un vector de presentación eucariota multi-cadena en una célula hospedadora eucariota y se cultivó la célula hospedadora transformada en condiciones apropiadas para la expresión y presentación del Fab en la superficie de la célula hospedadora.

Se prepararon los clones de levadura EBY100 pTQ3-F2, EBY100 pTQ3-PH1, EBY100 pTQ3-E7, EBY100 pTQ3-E8, EBY100 pTQ3-A9 y EBY100 pTQ3-A11, se cultivaron y se indujo la expresión de anticuerpos, de la forma descrita en el Ejemplo 2 anterior. Se extrajeron tres alícuotas de 0,2 ml de células de levadura con una DO_{600} de 1,0 antes de la inducción con galactosa, como punto T_0 .

Después de inducir la expresión con galactosa (Ejemplo 2), se extrajeron otras tres alícuotas adicionales de 0,2 ml, con una DO_{600} de 1,0. Las muestras de levadura se centrifugaron y el sedimento de células se suspendió nuevamente en PBS que contuvo 1 mg/ml de BSA.

Se centrifugaron nuevamente dos muestras y se suspendieron otra vez los sedimentos de células en 100 ml de anticuerpo anti-c-Myc (2,5 µg por muestra), o 100 ml de anticuerpo anti-HA (2,0 µg por muestra). A continuación, se incubaron las muestras durante una hora a temperatura ambiente, se sedimentaron las células y se lavaron una vez con

0,5 ml de PBS/BSA. A continuación, las muestras se incubaron con anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado con FITC (dilución 1:40) durante 1 hora en la oscuridad.

Las muestras celulares se marcaron con estreptavidina-FITC (dilución 1:20) en PBS/BSA al 1% (peso/volumen) y se incubaron durante una noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Todas las muestras se centrifugaron y los sedimentos celulares se lavaron una vez con 0,5 ml de PBS y, luego, se suspendieron nuevamente en 500 ml de PBS.

La presencia de anclaje a la superficie celular de Fab-antígeno se detectó por citometría de flujo. Las células antes de la inducción no mostraron presentación alguna de cadena ligera, cadena pesada o anclaje funcional de estreptavidina al anticuerpo Fab. Tras la inducción de la expresión de Fab, fue posible detectar células de levadura que presentan LC, HC y también unión funcional de estreptavidina al anticuerpo Fab por inmunofluorescencia (Fig. 4C), por FACS (Fig. 5A-C) y ELISA de células enteras de levadura (Fig. 6, véase el Ejemplo 7). También se pudo demostrar la presentación funcional de los anticuerpos Fab anti-CTLA-4 (datos no mostrados).

En el caso de EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pTQ3-PH1, el unión a antígeno detectada por FACS se pudo completar con antígeno soluble no marcado. La unión competitiva mostró la absoluta especificidad del anticuerpo Fab ensamblado de forma combinatoria, presentado en la superficie de la célula de levadura (Figura 5C).

Ejemplo 4

Enriquecimiento Preferencial de Células de Levadura que Presentan Fab: Detección por Selección con Perlas Magnéticas

Para demostrar que las células de levadura que presentan un anticuerpo Fab específico para el antígeno pueden ser enriquecidas con respecto a un exceso de células de levadura irrelevantes, se llevaron a cabo experimentos para la selección de modelo usando un dispositivo automatizado de selección con perlas magnéticas.

La célula de levadura que presenta Fab EBY100 pTQ3-F2 (con un marcador seleccionable auxótrofo de triptófano) se mezcló con células de levadura inespecíficas en diferentes relaciones. Las células de levadura inespecíficas consistieron en EBY100 pUR3867 (Unilever Research, V_L Aardingen, Holanda), que codifican un anticuerpo scFv específico para mucina-1 (PH1), y son portadoras de un marcador seleccionable auxótrofo de leucina. La relación de células *Leu⁺/Trp⁺* antes y después de la selección se utilizó para calcular el factor de enriquecimiento después de 1 ciclo de selección.

Se cultivaron clones de levadura y se indujo la expresión de anticuerpos con galactosa, como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los dos clones de levadura se mezclaron en la relación indicada anteriormente, y se incubaron durante 1 hora con 100 μ l de perlas paramagnéticas de estreptavidina (Dynal M280, Dynal Biotech, Oslo, Noruega) en un volumen final de 1 ml de solución salina tamponada con fosfato al 2% (por ejemplo, 2% de MARVEL-PBS o "MPBS", Premier Brands Ltd., Reino Unido).

Después de la incubación de la mezcla de levadura-perlas, se lavaron los complejos célula-perlas durante 11 ciclos en MPBS al 2%, mediante la transferencia de los complejos de un pocillo al siguiente pocillo en un dispositivo automatizado de selección de perlas magnéticas. Después del lavado con MPBS al 2%, se llevaron a cabo otras dos etapas de lavado con PBS. En el último pocillo del dispositivo automatizado de selección de perlas magnéticas, los complejos de célula-perlas se suspendieron nuevamente en 1 ml de PBS y se determinaron los títulos mediante la siembra en placas de agar SDCAA+G o con un medio sintético definido que contuvo glucosa al 2% (peso/volumen) que contuvo medio de desecho de leucina más 2% de agar (placas de agar SD-Leu+G). Para la selección por la clasificación de células magnéticas activadas (MACS), las células de levadura se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con 500 μ l de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en 6 ml de PBS+EDTA 2 mM. La mezcla de células/perlas se cargó en una columna LS lavada previamente (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en presencia de un imán, y la columna se lavó dos veces con PBS+EDTA 2 mM. Después de retirar el imán, las células de levadura fijadas se eluyeron con 6 ml de tampón PBS.

Para las selecciones de levadura usando el dispositivo de lavado capilar (CWD), la mezcla de células de levadura y 100 μ l de perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal M280) se bloqueó en 1 ml de MPBS al 2% durante 1 hora. Las perlas paramagnéticas se suspendieron nuevamente en 1 ml de suspensión de células de levadura y se hicieron rotar suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente en un tubo de Eppendorf. Tras la incubación de las células de levadura con las perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, la mezcla se introdujo en el capilar (se usó 1 ml para cargar un capilar en 5 etapas de 200 μ l) del CWD. Después del lavado automatizado y la nueva suspensión de la mezcla de células-perlas, se llevó a cabo un lavado final con PBS y se recogió el complejo de levadura/perlas mediante el ajuste del imán.

El uso de dos marcadores seleccionables permitió discriminar la levadura específica (capaz de crecer en placas de agar selectivo, sin triptófano) de las células de levadura inespecíficas (que son capaces de crecer en placas de agar selectivas sin leucina). Se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) para cada título.

ES 2 327 905 T3

El factor de enriquecimiento se calculó como la relación de células de levadura específicas antes y después de la selección, dividido por la relación de la levadura inespecífica antes y después de la selección.

TABLA 1

Modelo de enriquecimiento de células de levadura que presentan Fab: Detección por selección de perlas magnéticas

Kingfisher			
Relación ^a	Células totales ^b	Enriquecimiento ^c	Recuperación (%) ^d
1/100	-10 ⁷	288.000	12,8
1/1000	-10 ⁸	1.100.000	6
1/10000	-10 ⁹	400.000	10,7
Dispositivo de Lavado Capilar (CWD)			
Relación	Células totales	Enriquecimiento	Recuperación (%)
1/100	-10 ⁷	76.000	4,7
1/1000	-10 ⁸	41.000	6
1/10000	-10 ⁹	10.000	5,3
MACS			
Relación	Células totales	Enriquecimiento	Recuperación (%)
1/1000	10 ⁷	100	12

a. relación de células positivas, EBY100 pTQ3-F2, con respecto a células de levadura negativas, EBY100 pUR3867-PH1

b. número total de células de levadura seleccionadas

c. factor de enriquecimiento como relación del número de células positivas frente a células negativas antes y después de la selección

d. porcentaje de células de entrada positivas retenidas tras la selección.

Como se muestra en la Tabla 1, las células de levadura específicas que presentan un anticuerpo Fab contra estreptavidina se pueden enriquecer en un orden de magnitud entre 2 y 6 con respecto a las células de levadura irrelevantes por medio de un ciclo de selección en un dispositivo automatizado de selección de perlas magnéticas tal como Kingfisher, un dispositivo de lavado capilar o por clasificación magnética de células activadas (MACS).

Ejemplo 5

Enriquecimiento Preferencial de Células de Levadura que Presentan Fab: Detección por Citometría de Flujo

Como una alternativa al método de elección de perlas magnéticas del anterior Ejemplo 4, se demostró el enriquecimiento en un anticuerpo Fab específico para un antígeno, con respecto a un exceso de células de levadura irrelevantes, usando técnicas de clasificación celular activadas por fluorescencia (FACS).

Las células de levadura que presentan Fab, EBY100 pTQ3-F2 (con un marcador seleccionable auxótrofo de triptófano) se mezclaron con las células de levadura inespecíficas, EBY100 (pUR3867-PH1) portadoras de un marcador auxótrofo de Leu, en relaciones de 1:100, 1:1000 y 1:10.000. La mezcla de células de levadura se incubó con estreptavidina-FITC 1 μ M (Dako, Carpintería, CA) y se permitió que se equilibrara durante 30 minutos a temperatura ambiente.

ES 2 327 905 T3

Se clasificaron tres mil células por citometría de flujo, y se recolectó 6,5% de células con la señal de fluorescencia más alta. Las células de levadura antes y después de la selección se sembraron en placa sobre placas de agar SDCAA+G y placas de agar SD-Leu+G, y se determinó el número de UFC. El factor de enriquecimiento se calculó como la relación de la relación resultante dividida por la relación inicial de EBY100 pTQ3-F2 y EBY100 pUR3867-PH1.

Después de un ciclo de FACS, EBY1200 pTQ3-F2 se enriqueció con respecto a EBY100 pUR3867-PH1 en diez veces (datos no mostrados).

TABLA 2

Factores de enriquecimiento determinados con el uso de FACS

Pureza inicial ^a (%)	Pureza clasificada ^b (%)	Factor de enriquecimiento ^c
1,6	85	52
0,79	29	36
0,02	5,2	212

a. porcentaje de células positivas (EBY100 pTQ3-F2) frente a células negativas (EBY100 pUR3867-PH1) antes de la selección

b. porcentaje de células positivas (EBY100 pTQ3-F2) frente a células negativas (EBY100 pUR3867-PH1) después de la selección

c. relación de pureza inicial frente a pureza clasificada

Ejemplo 6

Transferencia Discontinua de una Biblioteca de presentación de Anticuerpos en Fago a un Vector de presentación eucariota Multi-cadena

Como demostración de la utilidad del sistema de transferencia de presentación en fago-presentación eucariota para transferir una biblioteca de péptidos de presentación en fago, de forma masiva, a un vector de presentación eucariota multi-cadena de la presente invención, se transfirió una biblioteca de Fab de presentación en fago, utilizando métodos conocidos en la técnica, al vector de presentación en levadura multi-cadena pTQ3 producido como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Para transferir el repertorio de presentación en fagos al vector de presentación en levadura multi-cadena, se utilizó el procedimiento de escisión/inserción única descrito anteriormente e ilustrado en la Fig. 1 (véase también el Ejemplo 1).

Se inoculó un cultivo de 50 ml de TYAG (TY, ampicilina 100 µg/ml, glucosa al 2%) con 10 µl de un stock de glicerol de un ciclo de selección de estreptavidina de una biblioteca de Fab no tratada previamente, clonada en un fago (de Haard, H. *et al.*, 1999). El cultivo se llevó a cabo durante una noche a 37°C y se preparó ADN plasmídico (sistema de purificación de plásmido QIAGEN, Qiagen, Valencia, CA).

El repertorio de anticuerpo Fab se digirió con *Apa*LI y *Not*II y se recuperaron fragmentos de anticuerpo Fab de aproximadamente 1,5 kb, que se purificaron por extracción de un gel de agarosa y bromuro de etidio TBE al 1,0% (kit de extracción en gel QIAEX, Qiagen, Valencia, CA).

De forma similar, el vector de presentación en levadura multi-cadena pTQ3 se digirió con *Apa*LI y *Not*II y se purificó un fragmento de aproximadamente 4,6 kb por extracción en un gel de agarosa y bromuro de etidio TBE al 1,0%.

ES 2 327 905 T3

La ligadura de los insertos de anticuerpo Fab recuperados de la biblioteca Fab en el plásmido pTQ3 digerido con ApaI y NotI se llevó a cabo en una relación de 4:1 (inserto-vector) usando 1 μ g de fragmentos Fab y 0,7 μ g de vector pTQ3 en 100 μ l de reacción durante una noche a 16°C. La mezcla de ligadura se purificó con extracciones en fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (PCI) y, posteriormente, precipitó con etanol al 100%.

La mezcla de ligadura purificada se transformó en la cepa TG1 de *E. coli* (Netherlands Culture Collection of Bacteria, PC 4028, Utrecht, Holanda) por electroporación, usando un Pulsador BioRad (BioRad, CA) a 2,5 kV, 25 mF y 200 W. La biblioteca se sembró en placa sobre placas de agar 2x TY (16 g/l de bacto-triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de bacto-agar) que contuvo 100 μ g/ml de ampicilina y 2% en peso/volumen de glucosa (placas TYAG). Después del crecimiento durante una noche a 37°C, se recuperó el repertorio en 2x medio TY más ampicilina 100 μ g/ml, mediante la inundación de las placas y congelación en alícuotas en glicerol al 15% (peso/volumen).

La biblioteca contuvo $5,6 \times 10^6$ clones independientes. Se usaron 15 μ l de una suspensión de biblioteca de $5,4 \times 10^{10}$ células/ml para inocular 100 ml de TYAG, y el cultivo se llevó a cabo durante una noche a 37°C. Se recuperó el ADN plasmídico de la forma descrita anteriormente.

El repertorio pTQ3-fab intermedio se sometió entonces a digestión con *AscI* y con *SfiI*. Se purificó un fragmento de aproximadamente 6,1 kb de la forma descrita más arriba. El vector fuente pTQ3 se digirió de manera similar con *AscI* y *SfiI* y se purificó un fragmento de aproximadamente 1150 pb.

Dicho fragmento purificado de 1150 pb se ligó con el repertorio pTQ3-fab digerido con *AscI* y *SfiI* en una relación de 6:1 (inserto-vector), usando 1,6 μ g de inserto y 1 μ g de vector. La mezcla de ligadura se purificó y transformó en la cepa TG1 de *E. coli*, como se ha descrito anteriormente, para dar una biblioteca final pTQ3-Fab de 1×10^6 clones independientes.

La biblioteca se recuperó de las placas del modo descrito más arriba, y se inocularon 10 ml en 50 ml de TYAG y se cultivó durante una noche a 37°C. Se preparó ADN plasmídico a partir de la biblioteca pTQ3-Fab y se transformó en la cepa de levadura EBY100 por el método de Gietz, D. *et al.* (1992) para dar una biblioteca final de 2×10^6 clones de levadura independientes.

Ejemplo 7

Selección de una Biblioteca de presentación de Fab Eucariota Transferida de Forma Discontinua: Detección por Selección de Perlas Magnéticas

Para demostrar que una biblioteca de presentación de Fab en levadura puede ser sometida a selección a partir de una población de células de levadura que presentan un repertorio diverso de anticuerpos Fab, se llevaron a efecto múltiples experimentos de selección usando un dispositivo automatizado de selección de perlas magnéticas.

El repertorio de levaduras preparado en el Ejemplo 6 se cultivó a 30°C en SDCAA+G y la expresión de anticuerpos se indujo con galactosa (como en el Ejemplo 4). La combinación de células de levadura se incubó durante 1 hora con 100 μ l de perlas paramagnéticas de estreptavidina (Dynal M280, Dynal Biotech, Oslo, Noruega), en un volumen final de 1 ml de PBS al 2%.

Después de la incubación de la mezcla de levadura-perlas, los complejos de célula-perlas se lavaron durante 11 ciclos en MPBS al 2%, mediante la transferencia de los complejos de un pocillo al siguiente en el dispositivo automatizado de selección de perlas magnéticas. Después del lavado con MPBS al 2%, se efectuaron dos etapas adicionales de lavado con PBS. En el último pocillo del dispositivo automatizado de selección de perlas magnéticas, los complejos de célula-perlas se suspendieron nuevamente en 1 ml de PBS y se determinaron los títulos de colonias de levaduras antes y después de la selección, sembrando sobre placas de SDCAA+G. Las células de levadura seleccionadas se utilizaron, entonces, para inocular un cultivo fresco de 10 ml de SDCAA+G y se llevó a cabo un segundo ciclo de selección, como se ha descrito anteriormente.

Se determinó el porcentaje de clones positivos y negativos por ELISA de levadura de células enteras después del primer ciclo de selección y después del segundo ciclo de selección. Las células se cultivaron y se indujeron en una placa de 96 pocillos (Corning Costar, Cambridge, MA) en 100 ml de SDCAA más 2% (peso/volumen) de galactosa.

Después de la inducción, las células se lavaron durante un ciclo con PBS y se dividieron en dos placas para la detección de la unión a antígeno y la presentación de la cadena pesada. En una placa, las células se suspendieron nuevamente en 100 μ l de MPBS al 2% que contuvo anti-estreptavidina-HRP (0,87 μ g/ml) para detectar el unión a antígeno. Las células de la segunda placa se suspendieron nuevamente en 100 μ l de MPBS al 2% que contuvo anti-c-Myc (1 μ g/ml) para detectar la presentación de la cadena pesada.

ES 2 327 905 T3

Después de una hora de incubación, las células se lavaron durante dos ciclos con PBS y la determinación de la unión específica se llevó a cabo mediante la resuspensión de las células en 100 μ l de una solución TMB. Después del desarrollo del color, la reacción se interrumpió con la adición de 50 μ l de ácido sulfúrico 2 N. Las células se sedimentaron por centrifugación y se transfirieron 100 μ l de sobrenadante a una placa flexible de 96 pocillos (Falcon, BD Biosciences, Bedford, MA) y se registró la absorbancia a 450 nm. Para la detección de la cadena pesada, se agregaron 100 μ l de MPBS al 2% que contuvo HRP anti-ratón de conejo (1:1000) a cada pocillo. Después de 1 hora de incubación, las células se lavaron durante dos ciclos y se detectó la presentación de la cadena pesada de la forma descrita más arriba. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3

Selección de Bibliotecas Fab de Levadura

Ronda	Inicio	Salida	Relación	% aglutinadores
1	$4,9 \times 10^9$	$1,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-5}$	20
2	$3,0 \times 10^9$	$3,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-4}$	100

Después de un ciclo de selección, 20% de los clones de levadura rastreados para la unión a antígeno demostraron ser positivos, y después de un segundo ciclo de selección, el número de clones de levadura reactivos al antígeno fue de 100%.

Ejemplo 8

Selección de Afinidad de Células de Levadura que Presentan Anti-Estreptavidina: Detección por Citometría de Flujo

En otro experimento de discriminación de afinidad, los clones EBY100 pTQ3-F2 y EBY100pTQ3-A127pESC contienen un vector vacío pESC (Stratagene, La Jolla, CA), portador del marcador auxótrofo Leu. El anticuerpo anti-estreptavidina F2 tiene una afinidad de 54 nM, según se determina por resonancia de plasmón (BIAcore), y el anticuerpo anti-estreptavidina A12 tiene una afinidad de aproximadamente 500 nM. Estos dos clones se cultivaron durante una noche y se diluyeron a una DO_{600} de 1,0 en SDCAA más 2% (peso/volumen) de galactosa, y se cultivaron durante 48 horas a 20°C. El clon que contiene el anticuerpo de alta afinidad (EBY100 pTQ3-F2) y el clon que contiene el anticuerpo de baja afinidad (EBY100 pTQ3-A12/clones pESC) se mezclaron en una relación de aproximadamente 1:100. El uso de los diferentes marcadores seleccionables presentes en cada clon permitió la discriminación de EBY100 pTQ3-A12/pESC (que sólo es capaz de crecer en placas selectivas de agar menos triptófano, menos leucina) de EBY100 pTQ3-F2 (que solo puede crecer en placas selectivas de agar menos triptófano). La mezcla celular se marcó como se ha descrito anteriormente, con la excepción de una dilución seriada de estreptavidina-FITC de 500 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM y 10 nM. Las células se clasificaron por citometría de flujo en un dispositivo EPIC ALTRA (Beckman Coulter, Fullerton, CA) sobre la base tanto de la expresión de LC como del unión a antígeno. La velocidad de clasificación se estableció en 2000 células/s y el umbral de clasificación se ajustó para recolectar 1% de la población celular con la máxima relación de FITC a PE (el histograma típico de FACS se muestra en la Fig. 7). Los niveles iniciales y finales de células tras la selección se titularon a diferentes concentraciones de antígeno en placas selectivas, y se determinó el número de colonias para calcular el factor de enriquecimiento y el porcentaje de recuperación del clon de máxima afinidad (Tabla 4). Estos resultados demuestran que el clon de afinidad mayor se puede recuperar preferiblemente por clasificación de citometría de flujo, y que la concentración óptima de antígeno se encuentra entre 100 nM y 25 nM para una mezcla de dos anticuerpos de $K_d = 54$ nM y K_d de aproximadamente 500 nM.

TABLA 4

Discriminación de afinidad de dos anticuerpos Fab de diferentes afinidades, presentados en levadura

Antígeno (nM) ^a	Título (-Trp) ^b	Título (-Trp/-Leu) Fab-A12 ^c	Título (-Trp)-(-Trp/-Leu) ab-F2 ^d	Porcentaje Fab-F2 ^e	Enriquecimiento
Inicial	3,2x10 ⁷	3,7x10 ⁷	4,7x10 ⁶	1,3	
Final					
500 nM	9x10 ³	8,9x10 ³	100	1,1	0,9
100 nM	1,3x10 ³	7,9x10 ²	5,6x10 ²	71	56
50 nM	2,4x10 ³	1,2x10 ³	1,2x10 ³	102	80
25 nM	1,2x10 ³	9,1x10 ²	3,2x10 ²	35	27
10 nM	1,53x10 ³	1,49x10 ³	45	3	2,3
a. Concentración de antígeno usada para marcar células de levadura antes de FACS b. Título de placas selectivas -Trp c. Título de placas selectivas -Trp/-Leu, representativo del número de colonias de levadura que contienen la construcción de anticuerpo pTQ3-A12 d. Título de placas -Trp menos título en placas selectivas -Trp/-Leu, representativo del número de colonias de levadura que contienen la construcción de anticuerpo pTQ3-F2 e. Porcentaje de células de levadura que contienen el anticuerpo de mayor afinidad pTQ3-F2 f. Relación de células de levadura positivas a negativas antes y después de la selección					

Ejemplo 9

Construcción de Bibliotecas Presentadas en Levadura, Diversificadas por PCR Propensa a Errores

Para demostrar la capacidad para generar nuevas bibliotecas de vectores de presentación multi-cadena, el anticuerpo Fab F2, específico para estreptavidina, se sometió a PCR propensa a errores. Se clonaron en el vector de presentación en levadura LC, HC y anticuerpo Fab total por separado. Se llevó a cabo la PCR propensa a errores en presencia de MgCl₂ 2,25 mM y MnCl₂ 0,375 mM durante 30 ciclos. Los productos purificados se clonaron en vectores de presentación en levadura pTQ3 como un fragmento *ApaLI/AscI*, fragmento *SfiI/NotI* o fragmento *ApaLI/NotI*, correspondientes a la LC, HC y un fragmento de Fab completo, como en el Ejemplo 2. La mezcla de ligadura se transformó en *E. coli* y se cultivó sobre placas de agar selectivas que contuvieron 100 µg/ml de ampicilina para dar un repertorio de LC de 5 x 10⁶, designado pTQ3F2-LC^{ep}, un repertorio HC de 5,6 x 10⁶, designado pTQ3F2-HC^{ep}, y un repertorio de Fab completo, designado pTQ3F2-Fab^{ep}. Los repertorios de cosecharon y se llevó a cabo una inoculación de 200 ml (suficiente para comprender al menos 10 veces la diversidad de biblioteca). Se aisló ADN plasmídico a partir de un cultivo de 200 ml y se transformó en la cepa de levadura EBY100, tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los repertorios resultantes se designaron EBY100-pTQ3F2-LC^{ep} (tamaño = 5 x 10⁶); EBY100-pTQ3F2-HC^{ep} (tamaño = 1,7 x 10⁶); EBY100-pTQ3F2-Fab^{ep} (tamaño = 10⁶). La frecuencia de mutación a nivel de nucleótidos fue 1,5% para la LC y 0,8% para la HC. La frecuencia de mutación a nivel de aminoácidos fue de 3% para la LC y de 1,3% para la HC.

Ejemplo 10

Selección de Afinidad de una Biblioteca de Células de Levadura que Presentan Anti-Estreptavidina: Detección por Citometría de Flujo

Para demostrar la selección de afinidad de cultivos nocturnos de bibliotecas de presentación en levadura multi-cadena, se prepararon las bibliotecas EBY100-pTQ3F2-LC^{ep}; EBY100-pTQ3F2-HC^{ep} y EBY100-pTQ3F2-Fab^{ep} como en el Ejemplo 2, y se diluyeron a una DO₆₀₀ de 1,0 en medios selectivos que contuvieron SDCAA más 2% (peso/volumen) de galactosa, y se cultivaron durante 48 horas a 20°C. El repertorio se marcó con mAb anti-HA (25 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una segunda etapa de incubación con FITC de Ig anti-ratón

de conejo (dilución 1:40) y PE estreptavidina 6 nM durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con 0,5 ml de PBS después de cada etapa de incubación y, después del lavado final, las células se conservaron en hielo para impedir la disociación del antígeno. Las muestras se clasificaron en un citómetro de flujo EPIC ALTRA con una velocidad de clasificación de 2000 células/s. El primer ciclo de clasificación se llevó a cabo en modo de enriquecimiento y el umbral de clasificación se ajustó para recolectar una población de células obtenidas sobre la base tanto de la expresión de LC como de unión a antígeno. El porcentaje de células recolectadas se redujo con ciclos sucesivos de selección para hacerlo coincidir con la diversidad decreciente del repertorio (Fig. 8A). A continuación, las células recolectadas se cultivaron hasta una DO_{600} de 1,0 a 30°C en SDCAA más (peso/volumen) glucosa, seguido de inducción con galactosa, como en el Ejemplo 2. Se repitió la selección en los ciclos 2 y 3, que se llevaron a cabo en modo de pureza con umbrales de clasificación decrecientes (Tabla 5). También se efectuó un análisis de FACS policlonal a diferentes concentraciones de antígeno, y en la Fig. 8B se muestran los histogramas de FACS tanto de la expresión de LC como de la actividad de unión a antígeno.

TABLA 5

Selección de repertorios propensos a errores

Ronda	Repertorio	Tamaño	Muestreo total	Ag (nM)	Estrategia	Modo FACS	% células recolectadas	% Unión Ag
R1	pTQ3F2LC ^{ep}	5x10 ⁵	6x10 ⁵	6	FACS	Enriquecimiento	6,0	40
R2	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	1,4	70
R3	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	0,2	75
R4	pTQ3F2HC ^{ep}	1,7x10 ⁶	3x10 ⁸	-	Kingfisher	-	-	23
R5	"	"	2x10 ⁶	6	FACS	Pureza	1,4	72
R6	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	0,5	62
R7	pTQ3F2Fab ^{ep}	10 ⁶	5x10 ⁶	6	FACS	Enriquecimiento	6,0	18
R8	"	"	4x10 ⁶	6	FACS	Pureza	1,4	60
R9	"	"	5x10 ⁶	6	FACS	Pureza	0,2	73

Ejemplo 11

Análisis de Anticuerpos Fab Seleccionados

Los clones de levadura recuperados de la selección de afinidad de los repertorios EBY100-pTQ3F2-LC^{ep}, EBY100-pTQ3-HC^{ep}, EBY100-pTQ3F2-Fab^{ep} se rastrearon por afinidad para cuantificar la mejora de la afinidad con respecto al anticuerpo natural inicial. Así mismo, se secuenciaron los anticuerpos seleccionados para determinar las mutaciones que se correlacionan con una afinidad optimizada.

Se recolectaron colonias de levadura y se suspendieron nuevamente en 25 μ l de solución de liticasa (2,5 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora a 37°C, después de lo cual se tomaron 2 μ l que se usaron en una reacción de PCR. Se amplificaron y secuenciaron las LC y HC separadas utilizando un secuenciador ABI-PRISM. Las mutaciones con respecto al tipo natural se determinaron usando alineación de secuencias y se muestran en la Tabla 6.

ES 2 327 905 T3

TABLA 6

Visión de conjunto de anticuerpos Fab mutados seleccionados a partir de repertorios propensos a error mediante FACS

Repertorio	Ronda	Clon	Secuencia V ₁	Secuencia V _H	Señal de FACS normalizada ¹
wt-F2					1,00
F2 LC ^{ep}	R1	RIC9	F621	/	
"	R1	R1H8	S2P, D85V	/	1,42
"	R1	R1H10	<u>H34R</u> , Y96H	/	1,15
"	R2	R2H8	S2P, D85V	/	1,23
"	R2	R2H10	<u>H34R</u> , Y96H	/	1,23
"	R2	R2A7	sin mut. de a.a	/	0,95
"	R3	R2H8	S2P, D85V	/	1,9
F2 HC ^{ep}	R3	R3H4	/	<u>H53R</u>	
"		R3D2	/	<u>H53R</u> ; S62A	
F2 Fab ^{ep}	R2	R2D3	<u>H34R</u>	sin mut. de a.a	1,65
"	R2	R2G4	V11A, <u>H34N</u> , V58A, S67P, <u>L95I</u>	P40L	O
"	R3	R3B1	<u>Y96F</u>	P40L	1,78
"	R3	R3H1	"	A23V, <u>S65R</u>	1,50
"	R3	R3E1	S2P, D85V	K14E	1,56
"	R3	R3G4	"	<u>H53R</u> , A84T	1,70
"	R3	R3F1	Q1L, K45R, <u>L95V</u>	sin mut. de a.a	1,60
"	R3	R3A3	<u>H34R</u>	sin mut. de a.a	1,65
"	R3	R3H3	<u>H34R</u> , Q79R	Q3R	1,62
Las mutaciones subrayadas están colocadas en los bucles de CDR del anticuerpo.					
Proporción de intensidad de fluorescencia media de unión a Ag/intensidad de fluorescencia media de presentación de LC de clon de ensayo a anticuerpo de partida de tipo silvestre.					

ES 2 327 905 T3

La disociación de los Fab seleccionados se determinó midiendo el índice de disociación en FACS como la disminución en la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo; el clon, R2H10 produjo la mayor mejora en afinidad (10,7 veces, 3,2 nM). Este índice de disociación se ajustó a un modelo de decaimiento exponencial y se calculó la k_d . Células de levadura se marcaron con tanto anti-HA para detectar la LC como también para antígeno con estreptavidina PE.

5 Los cultivos de levadura se cultivaron e indujeron como se ha descrito en el Ejemplo 2 y aproximadamente 2×10^7 células se recogieron y se lavaron con PBS. Después, las células se incubaron con 100 μ l de Mab anti-HA (20 μ g/ml) durante 1 hora y después se lavaron con 0,5 ml de PBS. Después, las células se incubaron con anti-FITC de ratón de conejo (1:40) y estreptavidina PE (dilución 1:40 de 1 μ g/ml de reserva) durante 1 hora en hielo. El sedimento celular después se resuspendió en un exceso de ligando no fluorescente a temperatura ambiente. La concentración de marcador no fluorescente se tomó de forma que fuera de 10-100 veces más de la concentración molar de anticuerpo Fab

10 presentado en levadura suponiendo que existen aproximadamente 100.000 copias de un anticuerpo Fab por célula de levadura. La disminución en la intensidad de fluorescencia se supervisó durante 1,5 min a 30 min mediante citometría de flujo. Se usaron células de levadura no marcadas para ajustar la fluorescencia de fondo. Después se calculó la k_d ajustando el índice de disociación a un modelo de decaimiento exponencial a partir del cual se calculó la k_d . La Figura

15 10c muestra la determinación de disociación mediante FACS para clones F2 de tipo silvestre y mutantes R2E10, R3B1 y R3H3.

La afinidad de Fab solubles se determinó subclonando los anticuerpos Fab seleccionados en el vector de expresión de *E. coli* pCES1 como en el Ejemplo 2. Los Fab solubles se purificaron y se ensayaron para determinar afinidad a través de BIAcore (de Haard, H. *et al.*). La afinidad de Fab seleccionados se muestra en la Tabla 7.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 327 905 T3

TABLA 7

Caracterización de fragmentos Fab mejorados para afinidad

Clon	Biblioteca	Variable de Mutaciones LC ³	Variable de Mutaciones HC ^{a,b}	k _d de FACS (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	Biacore ^c			
					k _d (10 ⁻³ s ⁻¹)	k _a (10 ⁴ M ⁻¹ s)	k _D nM	factor
wt-F2	/	ninguno	ninguno	2,2 ± 1,0	1,52 ± 0,15	4,51 ± 0,01	34	/
R2H10	LC e.p.	<u>H34R</u> , <u>Y96H</u>	ninguno	0,5 ± 0,1	0,18 ± 0,01	5,69 ± 0,02	3,2	10,7
R3A9	"	S2P, D85V	ninguno	1,3 ± 0,1	1,53 ± 0,57	7,84 ± 0,08	19,5	1,7
R3H4	HC e.p.	ninguno	<u>H53R</u>	1,9 ± 0,7	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
R3D2		ninguno	<u>H53R</u> , S62A	1,6 ± 0,6	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
R2D3	fab e.p.	<u>H34R</u>	1 mut. silente	2,1 ± 0,3	1,04 ± 0,10	5,76 ± 0,08	18,1	1,9
R3H1	"	<u>Y96F</u>	<u>A23V</u> , S65R	1,0 ± 0,4	0,28 ± 0,04	3,25 ± 1,14	8,7	3,9
R3G4	"	S2P, D85V	<u>H53R</u> , A84T	3,5 ± 1,1	2,37 ± 0,25	10,9 ± 1,13	21,7	1,6
R3B1	"	<u>Y96F</u>	P40L	0,9 ± 0,2	0,22 ± 0,05	4,00 ± 1,30	5,5	6,3

5	R3E1	"	S2P, D85V	K14E	2,1 ± 1,2	1,03 ±	7,64 ±	13,5	2,5
						0,10	0,95		
10	R3H3	"	Q79R	Q3R	2,0 ± 1,0	1,04 ±	11,3 ±	9,2	3,7
						0,04	2,64		
a. numeración de resto de anticuerpo de acuerdo con Kabat <i>et al.</i>									
b. las mutaciones subrayadas están en los bucles de CDR									
c. los valores presentados son las medias de tres experimentos independientes									

Ejemplo 12

Selección Rápida de Repertorio de Fab Presentado en Levadura Usando una Combinación de Selección de Kingfisher y FACS

Para acelerar la selección por afinidad de repertorios presentados en levadura y también para desarrollar metodologías que permitan la selección de repertorios mayores de más de 10^8 , se usó una combinación de tanto Kingfisher como la primera ronda de selección (como en el Ejemplo 4) y FACS para las últimas rondas de selección (como en el Ejemplo 5). El repertorio de LC construido en el Ejemplo 9 se cultivó durante la noche y se indujo la expresión de anticuerpo como en el Ejemplo 2. La población de células de levadura se incubó con partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y se seleccionó con Kingfisher como en el Ejemplo 4. En paralelo, se seleccionó el mismo repertorio mediante FACS como en el Ejemplo 5. El grupo de células de levadura de las campañas de selección de la ronda 1 usando Kingfisher y FACS se cultivó durante la noche y se indujo la expresión de anticuerpo como en el Ejemplo 5. Las células de levadura se marcaron como en el Ejemplo 2 y se seleccionaron mediante FACS como la segunda ronda. El análisis de los grupos seleccionados de levaduras que presentaban Fab se realizó usando FACS policlonal (véase el Ejemplo 10). Se puede observar que el porcentaje de células que se unían a antígeno aumentaba más rápidamente cuando se usa Kingfisher como la primera ronda de selección preferentemente a FACS (Figura 8d).

Ejemplo 13

Construcción de un Vector de Presentación Eucariota de Cadena Pesada de Ig: pTQ5-HC

Como una demostración de una realización alternativa del vector de presentación eucariota multi-cadena de la presente invención (específicamente, un vector de presentación eucariota multi-cadena en el que las cadenas de la cadena múltiple están codificadas en vectores separados, formando de ese modo componentes separados de un conjunto de vectores), se construyó un vector de presentación en levadura eficaz en una célula de levadura hospedadora transformada con el vector para expresar, transportar y presentar un fragmento de cadena pesada de Ig como un vector de un conjunto de vectores correspondiente.

Se construyó un vector de presentación de fragmento de HC alterando adicionalmente el vector pTQ3 producido de acuerdo con el Ejemplo 1. El vector de presentación TQ3 se digirió con *Bse*RI, identificando de ese modo un sitio de restricción diseñado del vector colocado en cada uno de los dos promotores GAL 1 conjuntamente (véase el Ejemplo 1, SEC ID N°: 5 bases indicadas 990-995). Se retiró un fragmento de 942 pb, que abarca uno de los sitios de clonación del vector de presentación multi-cadena (Fig. 3) y la cadena principal del vector de 4,868 pb restante se purificó en gel usando técnicas conocidas en el campo (específicamente a través de GFX PCR y el Gel Band Purification Kit, Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). La cadena principal del vector se volvió a ligar y se transformó en *E. coli*. El vector resultante, denominado "pTQ5", se verificó usando análisis de restricción.

La HC para el anticuerpo anti-Fab de estreptavidina F2 se digirió por restricción a partir de pTQ3-F2 como un fragmento de 709 pb *Sfi*I/*Not*I, se purificó y se clonó en el vector digerido con *Sfi*I/*Not*I pTQ5. El vector de presentación de HC resultante se denominó "pTQ5-HC" (Fig. 9).

Se realizaron modificaciones posteriores a este vector insertando un marcador 6xHis para purificación de anticuerpos Fab solubles y recolocando el codón de detención (TAA) en el extremo del marcador myc, antes del sitio *Pac*1, para eliminar aminoácidos innecesarios. Otras modificaciones han incluido la remoción de un sitio de restricción

ES 2 327 905 T3

*Xba*I endógeno dentro del marcador selectivo Trp mediante mutagénesis dirigida a sitio. Esto se realizó para facilitar la clonación y manipulación de anticuerpos candidatos a partir del conjunto de la biblioteca CJ (Dyax Corporation, Cambridge, MA).

Ejemplo 14

Expresión en Células Hospedadoras Eucariotas de un Vector de Presentación Eucariota de Cadena Pesada de Ig: Expresión de HC en una Célula de Levadura Haploide

Para demostrar la utilidad de vectores independientes de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena, se insertó un vector de presentación en levadura (de un conjunto de vectores) que codificaba un fragmento de cadena pesada de Ig en una célula hospedadora eucariota y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para expresión del componente de cadena pesada de un Fab de Ig.

La cepa de levadura EBY100 (In Vitrogen, Carlsbad, CA) se transformó con el vector pTQ5-HC (del Ejemplo 13) y por separado con pTQ5 como un control, a continuación de procedimientos de transformación descritos previamente. Los transformantes satisfactorios, denominados EBY100 pTQ5-HC y EBY100 pTQ5 respectivamente, se cultivaron durante la noche a 30°C en 10 ml de SDCAA+G.

Al día siguiente los cultivos se centrifugaron y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SDCAA más galactosa al 2% (p/v) a una DO_{600} de 1. Después, los cultivos celulares se cultivaron durante 24 horas a 20°C para inducir la expresión del producto de fusión de cadena pesada Aga2p. Las células se centrifugaron y lavaron dos veces en 1 ml de agua estéril y se transfirieron a un matraz eppendorf.

Los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 ml de tampón de muestra SDS-PAGE más DTT y se aplicaron perlas de vidrio (425-600 micras) inmediatamente por debajo del menisco. La suspensión de células y perlas se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto manteniendo la suspensión en hielo entre las agitaciones en vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se calentó hasta 100°C durante 5 minutos.

Las muestras de proteína se separaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia de western. La detección de polipéptido de fusión Aga2p-HC se realizó usando un anticuerpo monoclonal anti-c-Myc conjugado a HRP (1 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia mejorada (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). El polipéptido de fusión de 45 kD Aga2p-HC se detectó aproximadamente. No se detectó producto de fusión de Aga2p-HC detectable en el clon de vector de control (vacío) EBY100 pTQ5 (Fig. 10).

Ejemplo 15

Presentación en Células Hospedadoras Eucariotas de un Vector de Presentación Eucariota de Cadena Pesada de Ig: Presentación de HC en la Superficie de una Célula de Levadura Haploide

Para demostrar la capacidad de un vector de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena de presentar la cadena anclada de un polipéptido multi-cadena en la superficie de una célula eucariota haploide, se insertó un vector de presentación en levadura (de un conjunto de vectores) que codificaba un fragmento de cadena pesada de Ig en una célula hospedadora eucariota y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para expresión y presentación del componente de cadena pesada de un Fab de Ig.

Se cultivó EBY100 pTQ5-HC (del Ejemplo 14) y se indujo la expresión de anticuerpo como anteriormente. La expresión de HC se indujo mediante 48 horas de cultivo con agitación a 20°C. Las muestras de levadura se centrifugaron y el sedimento celular se resuspendió en PBS que contenía un 1 mg/ml de BSA. Dos de las muestras se centrifugaron nuevamente y los sedimentos celulares se resuspendieron por separado en 100 µl de anti- C_H1 humano (25 µg/ml; Zymed, San Francisco, CA) seguido por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron y lavaron una vez con 0,5 ml de PBS/BSA al 1% (p/v). Después, las muestras de células se incubaron con anti-FITC de ratón de conejo (dilución 1:50; Dako, Carpintería, CA) durante 1 hora en la oscuridad.

Para detectar la unión a antígeno, las células se marcaron con estreptavidina-FITC (dilución 1:25; Dako, Carpintería, CA) en PBS/BSA al 1% (p/v) y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Todas las muestras se centrifugaron y los sedimentos celulares se lavaron una vez con 0,5 ml de PBS y después se resuspendieron en 500 µl de PBS.

La presencia de HC unida a superficie celular-unión a antígeno se detectó mediante citometría de flujo. Antes de la inducción las células no mostraron presentación de cadena pesada o unión a estreptavidina funcional. Después de la inducción de expresión de HC, se pudieron detectar sólo células de levadura que presentaban cadena pesada, pero no se pudo detectar unión a estreptavidina funcional como se esperaba (Fig. 11).

Ejemplo 16

Construcción de un Vector de Presentación Eucariota de Cadena Ligera de Ig: pTQ6-LC

5 Se construyó un vector de presentación en levadura de cadena ligera para proporcionar un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena, es decir, cuando se usaba junto con el vector de presentación en levadura de cadena pesada descrito anteriormente (véase el Ejemplo 13, anteriormente).

10 Se construyó un vector de expresión en levadura de LC amplificando un fragmento que contenía el anti-LC de estreptavidina fusionado al marcador de epítipo de HA y secuencia de señal de Aga2p. El producto de amplificación se purificó en gel usando un GFX PCR y un Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) y se digirió con *Hind*III y *Pme*I. El fragmento de LC de 783 pb se purificó en un gel de TAE al 1,2%-agarosa junto con la cadena principal del vector de 4.323 pb de un vector pYC6/CT digerido con *Hind*III/*Pme*I (InVitrogen, Carlsbad, CA). El fragmento de LC y el vector pYG6/CT se ligaron juntos y la mezcla de ligación se transformó en la cepa TG1
15 de *E. coli*. El vector de expresión de LC resultante se denominó "pTQ6-LC" (Fig. 12).

Ejemplo 17

20 *Expresión en Células Hospedadoras Eucariotas de un Vector de Presentación Eucariota de Cadena Ligera de Ig: Expresión de LC Soluble en una Célula de Levadura Haploide*

Para demostrar la utilidad de vectores independientes de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena, se insertó un vector de presentación en levadura (de un conjunto de vectores) que codificaba un fragmento de
25 cadena ligera de Ig en una célula hospedadora eucariota y la célula hospedadora transformada se cultivó en condiciones adecuadas para expresión de un componente de cadena ligera soluble de un Fab de Ig.

La cepa de levadura W303-1B (*a/alpha ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/eu2-3,112 trp1-1/trp1-1 his 3-11,15/his3-11,15 ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100*), obtenida de P. Slonimski, se transformó con pTQ6-LC (del Ejemplo 16) y por separado pYC6/CT como un control, a continuación de los procedimientos de transformación descritos previamente.
30 Los transformantes satisfactorios, denominados W303 pTQ6-LC y W303 pYC6/CT respectivamente, se cultivaron durante la noche a 30°C en 10 ml de SD-G más 300 µg/ml de Blasticidin® (SD-G+BIs).

El día siguiente los cultivos se centrifugaron y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SD + BIs más galactosa al 2% (p/v) a una DO₆₀₀ de 0,4. Después, los cultivos celulares se cultivaron durante 24
35 horas a 20°C para inducir la expresión del polipéptido de cadena ligera soluble. Las células se centrifugaron y los sobrenadantes se concentraron diez veces usando una unidad de filtro centrífugo (CENTRICON YM-10; Millipore, Bedford, MA).

Los sedimentos celulares se lavaron y resuspendieron en tampón de parada (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, glicerol al 5% (p/v) más cóctel inhibidor de proteasa; Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) a una DO₆₀₀ de 50 y se aplicaron perlas de vidrio (425-600 micras) inmediatamente por debajo del menisco. La suspensión de células y perlas se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto manteniendo la suspensión en hielo entre agitaciones en vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se calentó una alícuota hasta 100°C durante 5 minutos en
45 tampón de muestra de SDS-PAGE más DTT.

Muestras de proteína se separaron en un gel de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia de western. La detección del polipéptido de LC se realizó usando un anticuerpo monoclonal anti HA (1 µg/ml) en combinación con un anti-ratón de conejo conjugado a HRP (1/1000). La inmunodetección fue mediante
50 quimioluminiscencia mejorada (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Los productos de polipéptido de 30 kD y 60 kD se detectaron en el sobrenadante de cultivo. No se pudo detectar producto de LC detectable en el control de vector vacío W303 pYC6/CT (Fig. 13).

55 Ejemplo 18

Presentación en Superficie de un Polipéptido Multi-Cadena en una Célula Hospedadora Eucariota: El Producto de Fusión Celular de un Par de Células Hospedadoras Haploides

60 Para demostrar la funcionalidad del proceso nuevo para presentar un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en la superficie de una célula eucariota diploide a través de la fusión celular de dos células eucariotas haploides, cada una de las cuales posee un vector diferente de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena correspondiente, células de levadura haploides que contenían un vector que expresaba un fragmento de cadena ligera de Ig soluble se aparearon con células de levadura haploides que contenían un vector que expresaba y presentaba un
65 polipéptido de fusión de anclaje de cadena pesada de Ig para producir una célula de levadura diploide que presenta un polipéptido Fab funcional en la superficie de la célula hospedadora.

ES 2 327 905 T3

Se cultivaron los clones de levadura W303 pTQ6-LC (del Ejemplo 17) y EBY100 pTQ5-HC (del Ejemplo 14) en placas de agar complementadas con Blastocidin® (In Vitrogen, Carlsbad, CA; 300 µg/ml; placas de agar de SD+G+Bls) o medio con triptófano retirado (placas de agar de SD-Trp+G). Después, estas placas se replicaron en placas selectivas dobles que contenían medio definido sintético para retirada de triptófano más 300 µg/ml de Blastocidin® (SD- Trp+G+Bls). La capa de células resultante de células de levadura diploides se sembró en estrías para colonias únicas. Se seleccionaron siete colonias Trp+/Bls^R y se cultivaron durante la noche con agitación a 30°C en 100 ml de SD+G-Trp+Bls en placas de 96 pocillos.

Al día siguiente, el cultivo se centrifugó y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SD-Trp+Bls más galactosa al 2% (p/v) o 10 ml de medio YP +Bls más galactosa al 2% (p/v) durante 24 horas a 20°C. Las células se lavaron en PBS y se dividieron equitativamente en tres placas de 96 pocillos. Las células de la primera placa se resuspendieron en 100 µl de estreptavidina-HRP (0,87 µg/ml), las células de la segunda placa se resuspendieron en 100 µl de anti-c-Myc-HRP (1 µg/ml) y las células de la tercera placa se resuspendieron en 100 µl de anti-HA (1 µg/ml) y se marcaron adicionalmente con un anti-HRP de ratón de conejo (1/1000).

Se realizó ELISA de células enteras de levadura (como en el Ejemplo 7) y se realizó FACS (como en el Ejemplo 15) para detectar unión a antígeno y presentación de HC. Todas las diploides ensayadas se unieron a estreptavidina y presentaron cadenas ligeras en ELISA de células enteras (Fig. 14) y FACS (Figs. 15A-C). Específicamente, la actividad de unión a estreptavidina se detectó en células de levadura diploides que presentaban anticuerpo Fab ensamblado de forma combinatoria (LC/HC diploide) en su superficie mientras que las células parentales haploides que expresaban sólo LC (W303 pTQ6-LC) o sólo HC (EBY100 pTQ5-HC) no mostraron actividad de unión. Células de levadura haploides convencionales que presentaban un anticuerpo Fab (EBY 100 pTQ3-F2) mostraron actividad de unión a estreptavidina. También, (como se esperaba) la célula de levadura parental haploide que expresaba sólo LC (W303 pTQ6-LC) no mostró presentación de HC, mientras que las células de levadura haploides convencionales que presentaban un anticuerpo Fab (EBY100 pTQ3-F2) mostraron presentación de HC.

Se seleccionaron cinco clones de levadura para cultivo durante la noche a 30°C en 10 ml de SD+G-Trp+Bls con agitación. Al día siguiente, los cultivos celulares se centrifugaron y las células de levadura sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de SD-Trp+Bls más galactosa al 2% (p/v) a una DO₆₀₀ de 0,4 durante 24 horas para inducir la expresión de vector. Un protocolo alternativo implica la resuspensión en 10 ml de medio YP más Blastocidin® más galactosa al 2% (p/v).

Después de la incubación de inducción de 24 horas, una alícuota de cada uno de los cinco cultivos de levadura diploide se sedimentó, se lavó y se resuspendió en tampón de parada a una DO₆₀₀ de 50. Se añadieron perlas de vidrio (425-600 micras) inmediatamente por debajo del menisco y la suspensión de células y perlas se agitó en vórtex 4 veces durante 1 minuto manteniendo la suspensión en hielo entre las agitaciones en vórtex. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y una alícuota se calentó a 100°C durante 5 minutos en tampón de muestra de SDS-PAGE más DTT.

Muestras de proteína se separaron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para transferencia de western. La detección del polipéptido de cadena ligera se realizó usando un anticuerpo anti-HA (1 µg/ml) en combinación con un anti-ratón de conejo conjugado a HRP en una membrana. La detección del polipéptido de fusión de cadena pesada-Aga2p se realizó usando un anticuerpo anti-c-Myc conjugado directamente a HRP (1 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). La inmunodetección fue mediante quimioluminiscencia mejorada (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Tanto el producto de LC de aproximadamente 30 kD como el producto de fusión de HC-Aga2p de aproximadamente 45 kD se detectaron en el lisado de levadura diploide (Figs. 16 y 17). No se detectó producto de fusión de LC o HC-Aga2p detectable en clones diploides de control que portaban los dos vectores vacíos pTQ5 y pYC6/CT.

También, después de la incubación de inducción de 24 horas, se analizó una segunda alícuota a partir de cada uno de los cinco cultivos de levadura diploide mediante citometría de flujo. Se lavaron 5 x 10⁶ células por agente de detección un ciclo con PBS y las células se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía anti-c-Myc (25 µg/ml) para detección de cadena pesada, 100 µl de PBS que contenía anti-estreptavidina-FITC (1:40) para detección de unión a antígeno y 100 µl de PBS que contenía anti-HA (25 µg/ml) para detección de cadena ligera. Las células se incubaron durante una hora en la oscuridad y después se lavaron de nuevo un ciclo con PBS. Después del lavado las células se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía anti-FITC de ratón de conejo (1:40) y se incubaron de nuevo durante 1 hora en la oscuridad.

Las células con anti-estreptavidina-FITC se procesaron durante la segunda etapa de incubación debido al marcaje de una etapa. Después de la incubación las células se lavaron durante un ciclo más y se resuspendieron en 500 µl de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Las cinco muestras demostraron que se unían al antígeno y que presentaban la HC así como la LC (Figs. 15A-C).

Después de la incubación (inducción) de 24 horas, también se marcó una tercera alícuota a partir de uno de los cinco cultivos de levadura diploides para inmunofluorescencia. 10⁸ células se resuspendieron en 100 µl de estreptavidina-FITC (30 µg/ml, Dako) o de una mezcla de anti-cadena lambda humana de conejo (1:40; Dako, Carpintería, CA) y anti-C_H1 monoclonal (25 µg/ml, Zymed, San Francisco, EE.UU.). Una primera muestra se incubó adicionalmente con anti-FITC de conejo (1:40; Dako, Carpintería, CA) y finalmente con anti-conejo de cerdo conjugado a FITC (1:20; Dako, Carpintería, CA). Una segunda muestra se sometió a un marcaje doble con anti-conejo de cerdo

conjugado a FITC (1:20; Dako, Carpinteria, CA) para la cadena ligera y anti-ratón de conejo conjugado a isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC, 1:30, Sigma, St. Louis, MO) para la cadena pesada (Figs. 18A-C).

Las diploides presentaron la cadena ligera y la cadena pesada en la superficie celular y demostraron que se unían a estreptavidina, como se esperaba. Las células parentales haploides que expresaban sólo HC se tiñeron sólo mediante el marcaje con TRITC de la cadena pesada. La célula parental haploide de LC fue negativa en todos los casos.

Ejemplo 19

Eficacia de Apareamiento de un Par de Células de Levadura Hospedadoras Haploides

Para demostrar la eficacia de fusión celular de dos células de levadura haploides, cada una de las cuales posee un vector diferente a partir de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena correspondiente como un proceso viable para generar células de levadura diploides que presentan un polipéptido multi-cadena biológicamente activo en su superficie, se determinó la eficacia de apareamiento para un par de células de levadura hospedadoras de acuerdo con la presente invención. La determinación cuantitativa de la eficacia de la reacción de apareamiento se evaluó de la manera siguiente.

Cada célula parental haploide EBY100 pTQ5 (del Ejemplo 14) y W303 pYC6/CT (del Ejemplo 17) se cultivó durante la noche a 30°C en el medio selectivo apropiado SD+G-Trp y SD+G+Blis respectivamente. 3×10^7 células de los dos cultivos haploides nuevos se mezclaron y recogieron en un filtro de nitrocelulosa de 45 mm (dispositivo microfil de Millipore, Bedford, MA). El filtro se incubó durante 4 horas a 30°C en una placa de medio rico no selectivo (YPD). Después, las células se resuspendieron en medio YPD y se titularon en los dos medios selectivos parentales y en el medio selectivo doble (que sólo permite el crecimiento de las diploides) SD+G-Trp+Blis. La inversión o resistencia espontánea se evaluó procesando cada célula parental haploide por separado de la misma manera y sembrándolas en placas en el medio selectivo doble sin dilución.

La eficacia de apareamiento de la célula parental haploide EBY100 pTQ5 se calculó de la manera siguiente: (el número de diploides en desarrollo en SD+G-Trp+Blis menos el número de EBY100 pTQ5 resistentes espontáneas en desarrollo en SD+G-Trp+Blis) dividido entre (el número total de células de la reacción de apareamiento que mostraban crecimiento en SD+G-Trp).

La eficacia de apareamiento de la célula parental haploide W303 (pYC6) se calculó de la manera siguiente: (el número de diploides en SD+G-Trp+Blis menos el número de células haploides W303pYC6/CT en desarrollo en SD+G-Trp+Blis) dividido entre (el número de células en SD+G+Blis).

3×10^7 células haploides de cada tipo de apareamiento produjeron $1,5 \times 10^7$ células diploides que contenían los vectores de expresión en levadura tanto pTQ5 como pYC6. Los resultados de eficacia de apareamiento revelaron que el 51% de células parentales haploides que contenían las diploides formadas por plásmido pTQ5 y que el 64% de células parentales haploides que contenían el plásmido pYC6 formaron diploides.

Ejemplo 20

Enriquecimiento Preferencial de Células de Levadura Diploides que Presentan un Anticuerpo Fab Ensamblado de Forma Combinatoria: Detección Mediante Citometría de Flujo

Para confirmar la capacidad de seleccionar células de levadura que presentan un anticuerpo Fab específico de antígeno en contraposición con un exceso de células de levadura no pertinentes, se usó separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se usó una célula de levadura diploide positiva que presentaba un anticuerpo Fab ensamblado de forma combinatoria específico para estreptavidina. La célula de levadura diploide portaba los marcadores fenotípicos de $\text{Trp}^+/\text{Leu}^-/\text{Blis}^R$ y era capaz de crecer en placas de agar selectivas que contenían Blastocidin® y menos triptófano. Esta diploide se denominó la diploide Blis^R . Se usó una célula diploide de levadura no pertinente que portaba los marcadores fenotípicos $\text{Trp}^+/\text{Leu}^+$ y fue capaz de crecer en placas de agar selectivas que contenían menos leucina y triptófano. Esta diploide se denominó la diploide Leu^+ . Las células de levadura diploides tanto positivas (Blis^R) como no pertinentes (Leu^+) se cultivaron durante la noche en medio de SD más glucosa al 2% (p/v) en condiciones selectivas de medio de -Trp/+Leu/+Blis y medio -Trp/-Leu respectivamente. Los cultivos de levadura se indujeron en medio YP que contenía galactosa al 2% (p/v). Después de determinar la DO_{600} del cultivo de levadura y usar el factor de conversión de DO_{600} de 1 es equivalente a 4×10^6 células/ml, se preparó una mezcla de células de levadura positivas a no pertinentes en una proporción aproximada de 1:10000. Para selección mediante FACS, la mezcla de células de levadura se marcó con estreptavidina PE 500 nM y se seleccionó como en el Ejemplo 8. Para Kingfisher, la mezcla de células de levadura se incubó con perlas recubiertas con estreptavidina y se seleccionó como en el Ejemplo 4. Para la selección mediante MACS, se incubaron diploides inducidas durante 1 hora a temperatura ambiente con 500 μl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en 6 ml de PBS + EDTA 2 mM. La mezcla de células/perlas se cargó en una columna de LS prelavada (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) en presencia de un imán y la columna se lavó de nuevo dos veces con PBS + EDTA 2 mM. Después de retirar el imán, las células retenidas en la columna se eluyeron en 6 ml de tampón PBS.

ES 2 327 905 T3

Las células de levadura se recuperaron y titularon en placas de agar selectivas para el fenotipo Bla^R o el fenotipo Leu^+ . La proporción de colonias de $\text{Bla}^R/\text{Leu}^+$ antes y después de la selección se usó para calcular el factor de enriquecimiento y el porcentaje de recuperación de células de levadura positivas.

TABLA 8

Experimentos de enriquecimiento de pase único usando MACS, Kingfisher y FACS

Dispositivo	Aportación			Producción			Recuperación	Enriquecimiento
	Diploide Leu^+	Diploide Bla^R	(%) de $\text{Bla}^R/\text{Leu}^+$	Diploide Leu^+	Diploide Bla^R	(%) de $\text{Bla}^R/\text{Leu}^+$		
MACS	5×10^8	4×10^4	0,008	3×10^5	10^4	3,6	25%	465
Kingfisher	6×10^8	4×10^4	0,0065	600	750	125	1,8%	19230
FACS	2×10^7	10^4	0,05	204	6	3,4	N.R	68

En el ejemplo dado de un anticuerpo específico para estreptavidina, se observó que Kingfisher producía un factor de enriquecimiento mayor que MACS. Sin embargo, el porcentaje de recuperación de células de levadura positivas fue significativamente menor. Usando FACS, se observó un factor de enriquecimiento de un orden de magnitud de una ronda de selección para un anticuerpo Fab anti-estreptavidina.

Ejemplo 21

Recombinación de LC y HC mediante Fusión Celular de un Par de Células Hospedadoras Haploides y Selección por Afinidad: Detección mediante Citometría de Flujo

Para ilustrar la utilidad de la fusión de dos células eucariotas haploides, cada una de las cuales posee un vector diferente a partir de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena correspondiente, se aparea una población de células de levadura haploides que contenía un vector que expresaba una pluralidad de variantes de fragmento de cadena ligera de Ig soluble (es decir, una biblioteca de variantes de LC) con una población de células de levadura haploides de tipo de apareamiento opuesto que contenía un vector que expresaba y presentaba una pluralidad de variantes de polipéptido de fusión de anclaje de cadena pesada de Ig (es decir, una biblioteca de variantes de HC) para producir una población nueva de células de levadura diploides que presenta una pluralidad de polipéptidos Fab funcionales en la superficie de las células hospedadoras (es decir, una biblioteca de Fab nueva).

Aislados de presentación en fago de Fab, preseleccionados para una molécula diana a partir de un repertorio de Fab, se usan para proporcionar los componentes de fuente de cadena ligera y cadena pesada para una transferencia discontinua de la información genética del aislado de presentación en fago a un conjunto de vectores de presentación en levadura multi-cadena (como se ha demostrado en el Ejemplo 6), usando el conjunto de vectores de presentación en levadura multi-cadena (como se ha descrito en los Ejemplos 14 y 17) para proporcionar recombinación nueva de aislados de cadena ligera y pesada a través de la fusión de células hospedadoras de dos células eucariotas haploides, cada una de las cuales posee un vector diferente a partir de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena correspondiente (como se ha demostrado en el Ejemplo 18).

Una biblioteca de anticuerpo de presentación en fago (de Haard, H. *et al.*, 1999) se sometió a una ronda de selección en partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina usando protocolos familiares para los especialistas en la técnica. Este repertorio se usó como un repertorio de partida para transferencia en el sistema de presentación en levadura. La aportación de la biblioteca fue 5×10^{12} partículas de fago y la producción después de una ronda de selección fue $3,75 \times 10^5$ partículas de fago.

Los fragmentos de HC se aislaron a partir de la biblioteca de presentación en fago seleccionada de la ronda 1 como fragmentos *SfiI/NotI* y se clonaron en el vector de presentación en levadura de cadena pesada de Ig pTQ5, que se digirió con *SfiI* y *NotI* (Ejemplo 13). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca de 10^8 . Después esta biblioteca se transformó en la cepa de levadura EBY100 para producir una biblioteca de 4×10^7 y denominada EBY100-pTQ5-HC^{rep}.

Los fragmentos de LC se aislaron a partir de la biblioteca de presentación en fago seleccionada de la ronda 1 como fragmentos *ApaI/AscI* y se clonaron en el vector de presentación en levadura de cadena ligera de Ig pTQ6, que se digirió con *ApaI* y *AscI* (Ejemplo 16). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca

ES 2 327 905 T3

de 1×10^8 . Después esta biblioteca se transformó en la cepa de levadura BJ5457 para producir una biblioteca de 8×10^7 y se denominó BJ5457-pTQ6-LC^{rep}. Los repertorios tanto de HC como LC en levaduras contenían suficiente diversidad para cubrir el repertorio de partida de $3,75 \times 10^5$ en fago. El análisis de identificación genética de ADN de clones individuales mostró diversos patrones de restricción indicando que segmentos diferentes de línea germinal estaban representados en las bibliotecas separadas de LC y HC.

En el primer régimen de apareamiento $7,25 \times 10^8$ células del repertorio de LC (BJ5457-pTQ6-LC^{rep}) se aparearon con $3,4 \times 10^8$ células de EBY100-pTQ5-F2HC que contenían la HC única específica para estreptavidina y obtenida a partir del clon F2. Las condiciones de apareamiento fueron bajo presión selectiva para mantener los plásmidos de expresión tanto de LC como de HC (auxotrofia de triptófano y resistencia a blastocidina). Se obtuvo una biblioteca de $1,9 \times 10^8$ diploides con una eficacia de apareamiento del 55%. El análisis de clones individuales de esta biblioteca mediante ELISA de células enteras de levadura mostró que el 100% de clones presentaba una HC y el 100% de clones presentaba una LC.

En un segundo régimen de apareamiento, $3,6 \times 10^8$ células del repertorio de HC (EBY100-pTQ5-HC^{rep}) se aparearon con 3×10^8 células de BJ5457-pTQ6-F2LC que contenían una LC única específica para estreptavidina y obtenida a partir del clon F2. Las condiciones de apareamiento fueron bajo presión selectiva para mantener los plásmidos de expresión tanto de LC como de HC (auxotrofia de triptófano y resistencia a blastocidina). Se obtuvo una biblioteca de 8×10^7 diploides con una eficacia de apareamiento del 27%. El análisis de clones individuales a partir de esta biblioteca mediante ELISA de células enteras de levadura mostró que el 89% de los clones presentaba una HC y todos estos clones presentaban una LC.

En un tercer régimen de apareamiento, $2,0 \times 10^{10}$ células del repertorio de HC (EBY100-pTQ5-HC^{rep}) se aparearon con $5,6 \times 10^9$ células del repertorio LC (BJ5457-pTQ6-LC^{rep}). Las condiciones de apareamiento fueron bajo presión selectiva para mantener los plásmidos de expresión tanto de LC como de HC (auxotrofia a triptófano y resistencia a Blastocidin®). Se obtuvo una biblioteca diploide de 4×10^9 con una eficacia de apareamiento del 68%. El análisis de clones individuales a partir de esta biblioteca mediante ELISA de células enteras de levadura mostró que el 94% de clones presentaba una HC y el 53% de clones presentaba una LC.

Esta serie de experimentos de apareamiento muestra que se pueden preparar bibliotecas grandes usando el apareamiento de repertorios separados de LC y HC. Estos repertorios comprenden diversos segmentos de línea germinal de gen V y se pueden expresar y presentar en la superficie de células de levadura. Estos repertorios se seleccionaron con el antígeno estreptavidina usando Kingfisher (véase el Ejemplo 7). Después de dos rondas de selección, el 97% de los clones recuperados mostraron actividad de unión a antígeno en un ELISA de células enteras de levadura (véase el Ejemplo 7).

Ejemplo 22

40 Construcción de Repertorios de LC y HC Diversificados mediante PCR Propenso a Error

Para demostrar la fusión de dos repertorios de células de levadura haploides, cada una de las cuales posee un vector diferente a partir de un conjunto de vectores multi-cadena correspondiente, que se puede usar para maduración de la afinidad, se construyeron un repertorio de HC diversificado mediante PCR propenso a error (Ejemplo 9) en pTQ5 (Ejemplo 13) y un repertorio de LC separado diversificado por PCR propenso a error (Ejemplo 9) en pTQ6 (Ejemplo 16) en células haploides de levadura de tipo de apareamiento opuesto.

El repertorio de HC se construyó amplificando el anticuerpo anti-estreptavidina F2 en condiciones propensas a error (Ejemplo 9). El fragmento amplificado se digirió con *SfiI* y *NotI*, se purificó y clonó en el vector de expresión de sólo HC pTQ5 (Ejemplo 13), que también se había digerido con *SfiI* y *NotI*. La mezcla de ligación resultante se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca de 7×10^7 . Esta biblioteca se transformó en la cepa de levadura EBY100 para producir una biblioteca de 9×10^6 y se denominó EBY100 pTQ5-HC*.

El repertorio de LC se construyó amplificando la LC del anticuerpo anti-estreptavidina F2 en condiciones propensas a error (Ejemplo 9). El fragmento amplificado se digirió con *ApaI* y *AscI* y se clonó en el vector de expresión sólo de LC (Ejemplo 16), que también se había digerido con *ApaI* y *AscI*. La mezcla de ligación resultante se transformó en *E. coli* para producir una biblioteca 4×10^7 y ésta se transfirió posteriormente a la cepa de levadura BJ5457 para producir una biblioteca de $1,8 \times 10^7$ (denominada BJ5457 pTQ6-LC*).

La frecuencia de mutación resultante en el nivel de nucleótido fue del 0,8% para el repertorio de HC y del 1,5% para el repertorio de LC. Estas frecuencias corresponden al 1,3% y el 3% de frecuencia de mutación en el nivel de aminoácido, respectivamente. Los repertorios de células haploides EBY100 pTQ5-HC* y el BJ5457 pTQ6-LC* se inocularon con $10 \mu\text{l}$ y $30 \mu\text{l}$ de reserva de glicerol respectivamente de forma que al menos 10 copias de cada clon independiente estuviera representada y se cultivara durante la noche en medio selectivo (Ejemplo 18). Se aparearon aproximadamente $1,6 \times 10^{10}$ células haploides correspondientes a BJ5457 pTQ6-LC* y 3×10^{10} células haploides correspondientes a EBY100 pTQ5-HC* (Ejemplo 19) para producir un repertorio diploide de 5×10^9 cuando se cultivaba en medio selectivo (denominado EBY100 pTQ5-HC*/BJ5457 pTQ6-LC*). Diez clones se eligieron y ensayaron mediante PCR de colonia de levadura (Ejemplo 11) para determinar la presencia de vectores que contenían LC y HC y

todos produjeron el producto de LC y HC esperado. Para determinar la fracción del repertorio diploide EBY100 pTQ5-HC*/BJ5457 pTQ6-LC* que presentaba un producto de HC y también demostraba unión al antígeno estreptavidina, se realizó un ELISA de células enteras de levadura (Ejemplo 7). El 68% (15/22) de diploides ensayados presentaron una HC y el 18% (4/22) de clones diploides ensayados mostraron unión a estreptavidina.

Para resaltar la versatilidad del procedimiento, se realizaron experimentos de apareamiento jerárquico similar donde el tipo silvestre de HC o el tipo silvestre de LC se mantuvieron constantes mientras se variaba sólo la cadena opuesta correspondiente. Usando el Fab anti-estreptavidina F2 como el anticuerpo modelo, se preparó un repertorio diploide para aparear EBY100 -pTQ5-F2HC y BJ5457 pTQ6-LC*. Este repertorio diploide tiene una HC constante y una LC variable. El apareamiento dio como resultado el 100% de diploides que presentan una HC y el 30% que muestra unión a antígeno mediante ELISA de células enteras de levadura. De forma similar, se preparó un repertorio diploide apareando BJ5457 pTQ6-F2LC con EBY100 pTQ5-HC*. Este repertorio diploide tiene una LC constante y una HC variable. Este apareamiento dio como resultado el 70% de diploides que presentan una HC y el 45% que muestra actividad de unión a antígeno mediante ELISA de células enteras de levadura.

Ejemplo 23

Selección por Afinidad de un Repertorio de Fab Ensamblado de Forma Combinatoria

Para demostrar que un repertorio de células de levadura que presenta una pluralidad de anticuerpos Fab ensamblados de forma combinatoria diversificado por PCR propenso a error se puede seleccionar por afinidad, se usó una combinación de selección mediante Kingfisher y separación citométrica de flujo que funciona con afinidad para recuperar los clones de afinidad óptima.

Se preparó un cultivo durante la noche (Ejemplo 18) del repertorio diploide EBY100pTQS-HC*/BJ5457pTQ6-LC* (Ejemplo 22). El cultivo se indujo como en el Ejemplo 18 y un total de 10^{10} células se sometieron a una ronda de selección por Kingfisher (Ejemplo 7). Las células diploides de levadura de unión a antígeno se recuperaron y sometieron a selección que funciona con afinidad de FACS (véase el Ejemplo 20). El porcentaje de clones de unión a antígeno aumentó durante la selección como se determinó mediante ELISA de células enteras de levadura (Ejemplo 7). El porcentaje de clon de unión a antígeno también aumentó y la intensidad de fluorescencia media de antígeno determinada por FACS aumentó durante la selección (Tabla 9).

TABLA 9

Selección de repertorio propenso a error de LC/HC apareado mediante combinación de Kingfisher y FACS

Ronda	Conc. de Ag	Células de aportación	Células de producción	% de células seleccionadas	% de unión ELISA	% de unión a Ag FACS	IFA de Ag
R0	-	-	-	-	18%	2,5%	1,46
R1	perlas	10^{10}	5×10^6	na	85%	35%	2,99
R2	6 nM	10^7	10^5	1,3%	68%	32,2%	7,62
R3	2 nM	10^6	7.500	0,7%	NR	NR	NR

El progreso de la campaña de selección se supervisó usando análisis de FACS policlonal donde se preparó un cultivo durante la noche de los repertorios seleccionados a partir de cada ronda de selección y la expresión de anticuerpos se indujo como en el Ejemplo 18. Las células de levadura se marcaron como en el Ejemplo 20 y se analizaron mediante FACS para tanto presentación de LC (marcador FITC) como unión a antígeno (marcador PE).

Los clones seleccionados se secuenciaron y las mutaciones en la LC variable y la HC variable se muestran en la Tabla 10. La afinidad de Fab seleccionados se determinó usando FACS mediante un ensayo de detección de disociación (Ejemplo 10) o mediante un análisis de cuadrados mínimos no lineal (datos no mostrados).

TABLA 10

Análisis de anticuerpos Fab seleccionados a partir de biblioteca combinatoria generada mediante apareamiento de levadura

Clon	Mutaciones de LC	Mutaciones de HC	FACS k_d e-4s-1	Aumento de factor	k_d de FACS (nM)	Aumento de factor
wt-F2	-	-	2,4	1	48	1
R2-12	wt	S19F	3	0,8	29	1,6
R2-11	T5A; <u>H34R</u>	Q3R; Q77L	1	2,4	23	2,1
R3-6	wt	<u>N32K</u> ; I69V; Q101V	2,1	1,1	14	3,4
R3-9	wt	<u>H53R</u> ; Q3R; G31R	1,1	2,2	20	2,4
R3-1	wt	G8S; S54R; T68S	-	-	-	-
R3-4	T24S; H34R	wt	-	-	-	-
R3-2	<u>H34R</u> ; L95H; Q79H	wt	1,6	1,5	35	1,4
R3-7	<u>H34R</u> ; <u>D32Y</u> ; P59S; T69S; A74T	A23D	0,7	3,4	17	2,8
R3-8	S27G; T76A	<u>H53R</u>	-	-	-	-

Ejemplo 24

Redistribución de Grupos Seleccionados de LC y HC

Para demostrar la versatilidad del procedimiento y la capacidad de realizar ciclos recursivos de selección y redistribución, se volvieron a redistribuir grupos de LC y HC seleccionados a partir de la producción de la tercera ronda de selección (Ejemplo 23) del repertorio combinatorio EBY100 pTQ5-HC*/BJ5457 pTQ6-LC*.

Se preparó ADN plasmídico usando un tratamiento de litocasa (Ejemplo 11) y el extracto de ADN que contenía plásmidos de expresión tanto pTQ5-HC*^{sel} como pTQ6-LC*^{sel} que contenían LC y HC seleccionadas se transformó directamente en células nuevas EBY100 y BJ5457, respectivamente. La mezcla de transformación se cultivó en placas selectivas de forma que sólo pudieran crecer colonias de BJ5457-pTQ6-LC*^{sel} (placas de agar selectivas que contenían blastocidina) o de EBY100 pTQ5-HC*^{sel} (placas de agar selectivas menos triptófano). La transformación de BJ5457 pTQ6-LC*^{sel} produjo 250 colonias y la transformación de EBY100 pTQ5-HC*^{sel} produjo 25 colonias. Estos dos mini-repertorios se recogieron y cultivaron durante la noche y se aparearon como en el Ejemplo 18. Esta reacción de apareamiento produjo un repertorio diploide de EBY100 pTQ5-HC*^{sel}/BJ5457 pTQ6-LC*^{sel} que cubrió la diversidad

ES 2 327 905 T3

combinatoria teórica de 6250 combinaciones diferentes de LC/HC. La expresión de anticuerpo Fab se indujo en el cultivo diploide y se seleccionó usando AutoMACS. Esto representó la cuarta ronda de selección. Se recuperó el cultivo diploide a partir de la cuarta ronda de selección. La expresión de anticuerpo se indujo, seguida de marcaje con estreptavidina PE a 0,5 nM y selección usando FACS (Ejemplo 20).

TABLA 11

Análisis de anticuerpos Fab

Clon	Mutaciones de LC	Mutaciones de HC	FACS k_d e-4s-1	Aumento de factor	k_d FACS (nM)	Aumento de factor
wt-F2	-	-	2,4	-1	48	1
R5-1	H34R; D32Y; P59S; T69S; A74T	N32K; I69V; Q101V	0,8	2,9	4,2	11,5
R5-12	H34R; D32Y; P59S; T69S; A74T	S19F	1	2,4	11,5	4,2

Ejemplo 25

Construcción de un Vector de Presentación en Levadura de Repertorio de HC sin Tratar y Célula Hospedadora Haploide

Para producir un vector de presentación eucariota de cadena pesada nuevo útil como un componente de un conjunto de vectores eucariota multi-cadena, un repertorio sin tratar de HC se clona en el vector pTQ5 (Ejemplo 13).

Fragmentos de HC de anticuerpo se aíslan a partir de una fuente de linfocitos de sangre periférica de gen V y se aíslan mediante métodos de PCR de anticuerpo conocidos en la técnica. La biblioteca de HC se captura en un vector de presentación en fago siguiendo técnicas conocidas en el campo y después se transfiere a pTQ5 como un fragmento *SfiI/NotI* y se transforma en *E. coli*, produciendo una biblioteca de aproximadamente 1×10^8 . Después la biblioteca se transforma en la cepa de levadura EBY100, produciendo biblioteca EBY100pTQ5-HC*^{rep} de aproximadamente 1×10^7 .

Ejemplo 26

Construcción de un Vector de Presentación en Levadura de Repertorio de LC sin Tratar y Célula Hospedadora Haploide

Para producir un vector de presentación eucariota de cadena ligera nuevo útil como un componente de un conjunto de vectores eucariota multi-cadena, un repertorio sin tratar de LC se clona en el vector pTQ6 (Ejemplo 16).

Fragmentos de LC de anticuerpo se aíslan a partir de una fuente de linfocitos de sangre periférica de gen V y se aíslan mediante métodos de PCR de anticuerpo conocidos en la técnica. La biblioteca de LC se captura en un vector de presentación en fago siguiendo técnicas conocidas en el campo y después se transfiere a pTQ6 como un fragmento *ApaLI/AscI* y se transforma en *E. coli*, produciendo una biblioteca de aproximadamente 1×10^8 . Después la biblioteca se transforma en la cepa de levadura W303, produciendo biblioteca W303 pTQ6-LC*^{rep} de aproximadamente 1×10^7 .

Ejemplo 27

Una Biblioteca de Recombinación de LC/HC a través de Fusión Celular de un Par de Células Hospedadoras Haploides y Selección por Afinidad Posterior: Detección mediante Citometría de Flujo

Para producir una biblioteca de presentación en levadura (diploide) de Fab nueva, dos poblaciones celulares hospedadoras (haploide); una población que contiene un repertorio de fragmentos de cadena ligera y la segunda población que contiene un repertorio de fragmentos de cadena pesada, se cocultivan en condiciones suficientes para permitir la fusión celular y la población diploide resultante cultivada en condiciones suficientes para permitir la expresión y presentación de la biblioteca de Fab recombinada (LC/HC).

Aproximadamente 10^{10} células de levadura EBY100 pTQ5-HC^{*rep} (del Ejemplo 26) se aparean con aproximadamente 10^{10} células de levadura W303 pTQ6-LC^{*rep} (del Ejemplo 22) siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 18. El diez por ciento de eficacia de apareamiento da como resultado un repertorio diploide de aproximadamente 10^9 (capturando de ese modo aproximadamente 10^9 combinaciones de LC/HC del máximo posible de diversidad combinatoria de LC/HC de 10^{14} , dada la diversidad de partida de los repertorios de LC y HC de componente individual en las células parentales haploides). El repertorio diploide se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (Ejemplo 15). El cultivo diploide se incuba con estreptavidina-FITC y se selecciona por afinidad usando separación citométrica de flujo (véase el Ejemplo 8). Las variantes de afinidad se detectan mediante determinación de disociación usando citometría de flujo (véase el Ejemplo 9) y adicionalmente mediante técnicas de resonancia de plasmón superficial conocidas en el campo, usando anticuerpos Fab solubles.

Ejemplo 28

Producción de una Biblioteca de Par de Células Hospedadoras de Presentación Multi-Cadena: Repertorios de Células de Levadura Haploides de LC y HC a través de Esporulación de Diploides

Como un ejemplo de una biblioteca de par de células hospedadoras nueva, en la que una población celular expresa una pluralidad de variantes de una cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a una proteína de anclaje y la segunda célula expresa una pluralidad de variantes de una segunda cadena soluble del polipéptido multi-cadena, aislados de levadura que presentan Fab diploides que se producen como resultado de la detección de selección de estreptavidina como se ha descrito en el Ejemplo 23 se inducen para esporular cultivando los aislados en condiciones de privación de nitrógeno (como se ha descrito en Guthrie y Fink, 1991). Los diploides esporulados se recogen, se tratan con zimolasa, se sonicen y se siembran en placas enriquecidas.

Las colonias haploides se separan en dos submuestras; una submuestra se cultiva en condiciones para facilitar la pérdida del vector de expresión de LC pero se selecciona para el vector de presentación de HC, la segunda submuestra se cultiva en condiciones para facilitar la pérdida del vector de presentación de HC pero se selecciona para el vector de expresión de LC (para plásmidos obtenidos de 2μ en condiciones no selectivas, la pérdida de plásmido está entre el 2-6% por generación). Después de varias generaciones, cada subcultivo de levadura se depura eficazmente de vector que expresa la cadena no seleccionada y contiene sólo el vector de expresión seleccionado (LC o HC), produciendo de este modo dos células de levadura haploides de expresión de cadena única polarizadas (es decir, preseleccionadas), denominadas "HAPLOID pTQ6-LC^{*sel}" y "HAPLOID pTQ5-HC^{*ser}". A partir de estas dos poblaciones de levadura haploides, cada una de las cuales contiene los Fab preseleccionados de cadena ligera o los Fab preseleccionados de cadena pesada, se establecen tres regímenes de apareamiento de la manera siguiente:

En el primer régimen de apareamiento, 10^9 HAPLOID pTQ6-LC^{*sel} de levadura se aparean de nuevo con 10^9 EBY100 pTQ5-HC^{*rep} de levadura (del Ejemplo 21) y se cultivan en condiciones selectivas para el mantenimiento de plásmidos de expresión en levadura tanto LC como HC. El diez por ciento de la eficacia de apareamiento da como resultado aproximadamente 10^8 diploides. El repertorio de diploides se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (Ejemplo 18). El cultivo diploide resultante representa un repertorio polarizado que contiene combinaciones únicas del repertorio de HC original frente al repertorio de LC preseleccionado, que se puede explorar adicionalmente mediante, por ejemplo, técnicas de separación citométrica de flujo (Ejemplos 8 y 11) y/o resonancia de plasmón superficial conocidas en el campo, usando anticuerpos Fab solubles.

En el segundo régimen de apareamiento, 10^9 HAPLOID pTQ6-HC^{*sel} de levadura se vuelven a aparear con 10^9 W303 pTQ6-LC^{*rep} de levadura (Ejemplo 22) y se cultivan en condiciones selectivas para mantenimiento de plásmidos de expresión en levadura tanto de LC como de HC. El diez por ciento de eficacia de apareamiento da como resultado aproximadamente 10^8 diploides. El repertorio de diploides se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (Ejemplo 18). El cultivo diploide resultante representa un repertorio polarizado que contiene combinaciones únicas del repertorio de LC original frente al repertorio de HC preseleccionado, que se puede explorar adicionalmente mediante, por ejemplo, técnicas de separación citométrica de flujo (Ejemplos 8 y 11) y/o resonancia de plasmón superficial conocidas en el campo, usando anticuerpos Fab solubles.

Finalmente, en el tercer régimen de apareamiento, 10^9 HAPLOID pTQ6-LC^{*sel} de levadura se aparean con 10^9 HAPLOID pTQ6 HC^{*sel} de levadura y se cultivan en condiciones selectivas para mantenimiento de plásmidos de expresión en levadura tanto de LC como de HC. El diez por ciento de la eficacia de apareamiento da como resultado

ES 2 327 905 T3

aproximadamente 10^8 diploides. El repertorio de diploides se cultiva y se induce la expresión de LC y HC (véase el Ejemplo 18). El cultivo diploide resultante representa un repertorio de recombinación polarizado que contiene combinaciones únicas del repertorio de LC preseleccionado frente al repertorio de HC preseleccionado, que se puede explorar adicionalmente mediante, por ejemplo, técnicas de separación citométrica de flujo (Ejemplos 8 y 11) y/o resonancia de plasmón superficial conocidas en el campo, usando anticuerpos Fab solubles.

Ejemplo 29

Maduración de la Afinidad mediante Diversificación Basada en Restricción de un Anticuerpo Fab

Para demostrar la utilidad de diversificación basada en restricción y redistribución de un anticuerpo Fab para maduración de la afinidad usando presentación y selección en levadura, se prepara una biblioteca de anticuerpo Fab a partir de un Fab específico de diana candidato donde la LC entera o un fragmento de la HC se diversifica usando clonación basada en restricción. En un método preferido, se usa una biblioteca de anticuerpo construida con sitios de restricción que tanto agrupa la secuencia de gen V de anticuerpo como también es interna a la secuencia de gen V para preparar una pluralidad de fragmentos de gen de anticuerpo para clonar y, de ese modo, conducir a la diversificación del anticuerpo candidato.

Se puede madurar la afinidad de los anticuerpos candidatos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpo de este tipo (por ejemplo, el conjunto de biblioteca CJ, Dyax Corp., Cambridge, MA) mediante este enfoque. Los anticuerpos que comprenden, por ejemplo, la biblioteca de fagémidos CJ tienen una LC asegurada por un sitio de restricción *Apa*L1 y *As*cI único y una HC asegurada por un sitio de restricción *Sfi*I y *Not*I único. La HC también contiene un sitio de restricción *Xba*I único e interno entre la secuencia de CDR2 y CDR3.

Para diversificar la LC en un anticuerpo candidato específico de antígeno único o un grupo de anticuerpos candidatos específicos de antígeno, en primer lugar el gen o los genes de anticuerpo Fab se clonan en el vector de presentación en levadura pTQ3 como en el Ejemplo 2, dando como resultado pTQ3-Fab. Una pluralidad de LC se aísla a partir de una preparación de ADN de la biblioteca de fagémido CJ mediante digestión de restricción con las enzimas de restricción de *Apa*L1 y *As*cI. pTQ3-Fab también se digiere con *Apa*L1 y *As*cI y la LC endógena se reemplaza por una pluralidad de LC dando origen a un repertorio pTQ3-LC^{cj-rep}. Después, este repertorio se transfiere en la cepa de levadura EBY100 para producir EBY100 pTQ3-LC^{cj-rep}.

Para diversificar la V_H CDR1-2 en un anticuerpo candidato específico de antígeno o un grupo de anticuerpos candidatos específicos de antígeno, en primer lugar el gen o los genes de anticuerpo Fab se clonan en el vector de presentación en levadura pTQ3 como en el Ejemplo 2 para producir pTQ3-Fab. Una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 se aísla a partir de la biblioteca de fagémido CJ mediante digestión de restricción con *Sfi*I y *Xba*I, pTQ3-Fab también se digiere con *Sfi*I y *Xba*I y el fragmento endógeno de V_H CDR1-2 se reemplaza por una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2, dando como resultado el repertorio pTQ3-V_H CDR1-2^{cj-rep}. Después, este repertorio se transfiere en la cepa de levadura EBY100 para producir EBY100 pTQ3-V_H CDR1-2^{cj-rep}.

Será evidente para los especialistas en la técnica que el procedimiento de clonación se puede realizar de varias maneras diferentes, por ejemplo, construyendo en primer lugar un repertorio de fragmentos V_H CDR1-2 y después clonando en la V_H CDR3 específica de antígeno o grupo de V_H CDR3.

Se prepara un cultivo de EBY100 pTQ3-V_H CDR1-2^{cj-rep} y EBY100 pTQ3-LC^{cj-rep} como en el Ejemplo 2. El cultivo de levadura después se marca para presentación de LC y unión a antígeno y se selecciona por afinidad mediante separación citométrica de flujo como en el Ejemplo 10. Después, los clones seleccionados se analizan para determinar su secuencia de ADN y su mejorar en afinidad como en el Ejemplo 10.

Ejemplo 30

Maduración de la Afinidad Mediante Redistribución Combinatoria de Fragmentos de Genes Usando Apareamiento de Levadura

Para demostrar que el apareamiento de levadura se puede usar para diversificación génica combinatoria y maduración de la afinidad de un anticuerpo candidato específico de antígeno o anticuerpos candidatos específicos de antígeno, una LC o grupo de LC seleccionadas se rediversifica o un fragmento de V_H CDR1-2 de una HC seleccionada o grupo de HC se rediversifica. Los anticuerpos que comprenden la biblioteca de fagémidos CJ son susceptibles de un enfoque de este tipo. Los mismos tienen una LC asegurada por un sitio de restricción *Apa*L1 y *As*cI único y una HC asegurada por un sitio de restricción *Sfi*I y *Not*I único. La HC también contiene un sitio de restricción *Xba*I interno y único entre la secuencia de CDR2 y CDR3. Ya que las LC y HC están presentes en célula de levadura de tipo de apareamiento opuesto, se usa apareamiento de levadura para unir LC específica de antígeno con una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 o HC específica de antígeno con una pluralidad de LC, eliminando de ese modo la necesidad de clonación basada en restricción para emparejar una LC con una HC.

En un método preferido para diversificar un anticuerpo candidato específico de antígeno o un grupo de anticuerpos candidatos específicos de antígeno, los genes de anticuerpo del componente HC se clonan en el vector de presentación en levadura pTQ5 como en el Ejemplo 13 para producir pTQ5-HC_{Ag}. Se prepara una pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 mediante digestión de los fragmentos de HC a partir de la biblioteca de fagémidos CJ con enzimas de restricción *Sfi*I y *Xba*I. Esta pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2 después se clona en ADN preparado a partir de pTQ5-HC_{Ag}, que se ha digerido con *Sfi*I y *Xba*I para retirar el fragmento de V_H CDR1-2 endógeno y para reemplazarlo con la pluralidad de fragmentos de V_H CDR1-2, reteniéndose la V_H-CDR3 específica de antígeno. Esto produce una biblioteca denominada pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3_{Ag}) y la misma se introduce en la cepa de levadura EBY100 para producir un repertorio EBY100 pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3_{Ag}). Una pluralidad de LC se aísla a partir de una preparación de ADN de la biblioteca de fagémidos CJ mediante digestión de restricción con *Apa*L1 y *Asc*I. Esta pluralidad de LC se clona en pTQ6 para producir un repertorio pTQ6-LC^{rep} y sirve como un repertorio maestro para maduración de la afinidad de otros anticuerpos específicos de otras dianas. Después, este repertorio se transfiere en una cepa de levadura del tipo de apareamiento opuesto, BJ5457, para producir BJ5457 pTQ6-LC^{rep}.

En un régimen de apareamiento, que permite la diversificación simultánea tanto de LC como del fragmento de gen de V_H CDR1-2, se preparan cultivos de EBY100 pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3_{Ag}) y BJ5457 pTQ6-LC^{rep} como en el Ejemplo 22. Los dos repertorios se aparean entre sí (véase el Ejemplo 19) para producir un repertorio diploide EBY100 pTQ5-V_H CDR1-2 (CDR3_{Ag})/BJ5457 pTQ6-LC^{rep}. La expresión de anticuerpo Fab se induce (véase el Ejemplo 18) y el repertorio diploide se selecciona por afinidad como en el Ejemplo 20. Los clones seleccionados se analizan para afinidad mejorada como en el Ejemplo 23.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y detalles en la misma sin alejarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de vectores de presentación eucariota de polipéptido multi-cadena que comprende:

- (a) un primer miembro de un conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular, en el que la secuencia de aminoácidos del anclaje de superficie celular no tiene un origen natural con la secuencia de aminoácidos del polipéptido con la que se fusiona;
- (b) un segundo miembro de un conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multi-cadena;

en el que el conjunto de vectores es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de las cadenas del polipéptido multi-cadena y en el que la primera cadena del polipéptido multi-cadena está unida a la superficie de una célula hospedadora eucariota por el anclaje de superficie celular y las cadenas del polipéptido multi-cadena se asocian de tal forma, que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula hospedadora eucariota, donde la célula hospedadora eucariota es una célula animal o una célula fúngica.

2. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, que comprende además

- (c) un tercer polinucleótido que codifica una tercera cadena del polipéptido multi-cadena; y
- (d) opcionalmente, un cuarto polinucleótido que codifica una cuarta cadena del polipéptido multi-cadena.

3. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que el polipéptido multi-cadena es un polipéptido de dos cadenas, seleccionado preferiblemente entre el grupo que consiste en: fragmentos Fab de inmunoglobulina, los dominios extracelulares de receptores de células T, moléculas de MHC de clase I y moléculas de MHC de clase II.

4. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que el polipéptido multi-cadena es un polipéptido de cuatro cadenas, en el que el polipéptido de cuatro cadenas comprende dos primeras cadenas y dos segundas cadenas.

5. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que el polipéptido multi-cadena es una inmunoglobulina (Ig), preferiblemente IgA, IgD, IgE o IgM, más preferiblemente IgG; o un fragmento de Ig, preferiblemente un Fab.

6. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que el anclaje es una proteína de superficie celular de una célula eucariota que se ancla preferiblemente a la superficie celular de la célula hospedadora eucariota.

7. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que el anclaje se selecciona entre el grupo que consiste en: a-aglutinina, componentes de a-aglutinina Agalp y Aga2p y FLO1.

8. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que, con la expresión, la primera cadena y el anclaje de superficie celular se expresan como una proteína de fusión en la célula hospedadora eucariota; la primera cadena está unida al anclaje de superficie celular mediante un enlace Jun/Fos; o la primera cadena del polipéptido multi-cadena está fusionada con Aga2p, donde Aga2p está unido covalentemente con Agalp, que, a su vez, está unido a la superficie de la célula hospedadora eucariota.

9. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que el primer nucleótido está unido operativamente a una secuencia señal de Aga2p y el segundo polinucleótido está unido operativamente con una secuencia señal de Aga2p; o en el que el primer polinucleótido está unido en fase con un polinucleótido que codifica un primer marcador de epítipo y el segundo polinucleótido está unido en fase con un polinucleótido que codifica un segundo marcador de epítipo.

10. El conjunto de vectores de presentación eucariota de la reivindicación 1, en el que el vector comprende además sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción localizados en los extremos 5' y 3' de un segmento polinucleotídico que incluye todos los polinucleótidos que codifican las cadenas del polipéptido multi-cadena; o sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción localizados en los extremos 5' y 3' de cada uno de los polinucleótidos, que codifican las cadenas del polipéptido multi-cadena.

11. Una biblioteca de vector que comprende un conjunto de vectores de presentación eucariota de acuerdo con la reivindicación 1 y opcionalmente una población heterogénea de polipéptidos multi-cadena.

12. Un método para presentar un polipéptido multi-cadena biológicamente activo sobre la superficie de una célula hospedadora eucariota que comprende utilizar el conjunto de vectores de la reivindicación 1.

13. El conjunto de vectores de presentación eucariota de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el polipéptido multi-cadena es un polipéptido de dos cadenas y el conjunto de vectores de presentación eucariota comprende un primer vector eucariota y un segundo vector eucariota, comprendiendo cada vector un polinucleótido que codifica una cadena del polipéptido de dos cadenas.

14. El conjunto de vectores de presentación eucariota de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el polipéptido multi-cadena es un polipéptido de tres cadenas y el conjunto de vectores comprende un primer vector eucariota, un segundo vector eucariota y un tercer vector eucariota, comprendiendo cada vector un polinucleótido que codifica una cadena del polipéptido de tres cadenas.

15. El conjunto de vectores de presentación eucariota de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el conjunto de vectores de presentación eucariota comprende al menos los siguientes tres vectores:

- (a) un primer vector eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica la primera cadena de un polipéptido de cuatro cadenas unido a un anclaje de superficie celular, en el que el vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de la primera cadena;
- (b) un segundo vector eucariota que comprende el primer polinucleótido que codifica la primera cadena del polipéptido de cuatro cadenas, en el que el vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de la primera cadena;
- (c) un tercer vector eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica la segunda cadena del polipéptido de cuatro cadenas, en el que el vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de la segunda cadena, formando de este modo un conjunto de vectores,

en el que en una célula hospedadora eucariota transformada con el conjunto de vectores, con la expresión del primer y segundo polinucleótido, la primera cadena del polipéptido de cuatro cadenas se une a la superficie de la célula hospedadora eucariota por el anclaje de superficie celular y la célula hospedadora muestra la actividad biológica del polipéptido de cuatro cadenas en la superficie de la célula hospedadora eucariota.

16. El conjunto de vectores de presentación eucariota de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que al menos un vector del conjunto de vectores de presentación eucariota es un vector de presentación dual y en el que el anclaje es un polipéptido funcional como un anclaje sobre la superficie de una célula eucariota y funcional como un anclaje sobre la superficie de un fago, preferiblemente en el que el anclaje es una parte de una proteína de superficie que se ancla a la superficie celular de una célula hospedadora eucariota y a la superficie de un fago.

17. Un método para presentar, sobre la superficie de una célula hospedadora eucariota, un polipéptido multi-cadena biológicamente activo que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) introducir en una célula hospedadora eucariota que es una célula animal o una célula fúngica un conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende:
 - (i) un primer vector eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica una primera cadena polipeptídica de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular,

en el que la secuencia de aminoácidos del anclaje de superficie celular no tiene un origen natural con la secuencia de aminoácidos del polipéptido con la que se fusiona y en el que el vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de la primera cadena; y
 - (ii) un segundo vector eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena polipeptídica del polipéptido multi-cadena, en el que el vector es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de la segunda cadena,

en el que una célula hospedadora eucariota transformada con el primer vector eucariota y el segundo vector eucariota muestra, con la expresión del primer y segundo polinucleótido y la unión de la primera cadena del polipéptido multi-cadena a la superficie de la célula hospedadora eucariota por el anclaje de superficie celular, la actividad biológica del polipéptido multi-cadena en la superficie de la célula hospedadora eucariota; y
- (b) cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del primer y segundo polinucleótido.

18. El método de la reivindicación 17, en el que la célula animal es una célula de mamífero o una célula de insecto; y en el que la célula fúngica es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Debaryomyces* o *Candida*, más preferiblemente, la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*, y más preferiblemente, la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

19. Un método para presentar un polipéptido multi-cadena biológicamente activo que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas en la superficie de una célula eucariota diploide que es una célula animal o una célula fúngica, que comprende:

- (a) proporcionar una primera eucariota haploide que comprende un primer miembro de un conjunto de vectores, comprendiendo dicho primer miembro un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular;
- (b) proporcionar una segunda célula eucariota haploide, donde la segunda célula eucariota haploide comprende un segundo miembro de un conjunto de vectores, comprendiendo dicho segundo miembro un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una segunda cadena del polipéptido multi-cadena;
- (c) poner en contacto la primera célula eucariota haploide con la segunda célula eucariota haploide en condiciones suficientes para permitir que las células se fusionen, produciendo una célula eucariota diploide; y
- (d) cultivar la célula eucariota diploide en condiciones suficientes para permitir la expresión y asociación de las cadenas del polipéptido multi-cadena, donde la primera cadena del polipéptido multi-cadena se une a la superficie de la célula hospedadora eucariota por el anclaje de superficie células y la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula eucariota diploide.

20. El método de la reivindicación 19, en el que la primera célula eucariota haploide y la segunda célula eucariota haploide son de tipo de apareamiento opuesto.

21. Un método para presentar un Fab sobre la superficie de una célula de levadura diploide que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una primera célula de levadura haploide que comprende un primer miembro de un conjunto de vectores, comprendiendo dicho primer miembro un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende las regiones Vh y ChI de una cadena pesada de Ig unidas a un anclaje de superficie celular;
- (b) proporcionar una segunda célula de levadura haploide, comprendiendo la segunda célula de levadura haploide un segundo miembro de un conjunto de vectores, comprendiendo dicho segundo miembro un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende una cadena ligera de Ig;
- (c) poner en contacto la primera célula de levadura haploide con la segunda célula de levadura haploide en condiciones suficientes para permitir que las células se fusionen, produciendo una célula de levadura diploide; y
- (d) cultivar la célula de levadura diploide en condiciones suficientes para permitir la expresión y asociación del primer y segundo polipéptido, donde el primer polipéptido del Fab está unido a la superficie de la célula de levadura por el anclaje de superficie celular y se muestra un Fab en la superficie de la célula de levadura diploide.

22. El método de la reivindicación 21, en el que la primera célula de levadura haploide y la segunda célula de levadura haploide son de tipo de apareamiento opuesto y son preferiblemente células de *Saccharomyces cerevisiae*.

23. Un método para detectar un polipéptido multi-cadena biológicamente activo que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas de una biblioteca de polipéptidos multi-cadena en células animales o células fúngicas, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una primera población de células eucariotas haploides que comprende una pluralidad de primeros miembros de un conjunto de vectores, comprendiendo dichos primeros miembros primeros polinucleótidos que codifican cada uno un polipéptido que comprende una primera variante de cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular;

(b) proporcionar una segunda población de células eucariotas haploides de tipo de apareamiento opuesto al de la primera población de células eucariotas haploides, donde la segunda población de células eucariotas haploides comprende una pluralidad de segundos miembros de un conjunto de vectores, comprendiendo dichos segundos miembros segundos polinucleótidos que codifican cada uno una segunda variante de cadena del polipéptido multi-cadena;

(c) poner en contacto la primera población de células eucariotas haploides con la segunda población de células eucariotas haploides en condiciones suficientes para permitir que células individuales de tipo de apareamiento diferente se fusionen, produciendo una población de células eucariotas diploides;

(d) cultivar las células eucariotas haploides en condiciones suficientes para permitir la expresión y asociación de las cadenas del polipéptido multi-cadena, donde la primera variante de cadena del polipéptido multi-cadena se une a la superficie de la célula hospedadora eucariota por el anclaje de superficie celular y la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de las células eucariotas diploides; y

(e) detectar una actividad biológica de interés particular.

24. El método de la reivindicación 23, que comprende además la etapa:

(f) aislar células eucariotas diploides que presenten la actividad biológica.

25. El método de la reivindicación 24, que comprende además las etapas de:

(g) repetir las etapas (d), (e) y (f).

26. El método de la reivindicación 24, que comprende además las etapas de:

(g) cultivar las células eucariotas diploides aisladas de la etapa (f) en condiciones suficientes para provocar que las células eucariotas diploides aisladas se sometan a meiosis, produciendo células eucariotas haploides;

(h) poner en contacto las células eucariotas haploides de la etapa (g) en condiciones suficientes para permitir que las células eucariotas de diferente tipo de apareamiento se fusionen, produciendo una población de células eucariotas diploides; y

(i) repetir las etapas (d), (e) y (f).

27. El método de la reivindicación 24, que comprende además las etapas de:

(g) cultivar las células eucariotas diploides aisladas de la etapa (f) en condiciones suficientes para provocar que las células eucariotas diploides aisladas se sometan a meiosis, produciendo células eucariotas haploides;

(h) poner en contacto las células eucariotas haploides de la etapa (g) con una o más poblaciones de células eucariotas haploides seleccionadas entre el grupo que consiste en:

(i) la primera población de células eucariotas haploides de la etapa (a);

(ii) la segunda población de células eucariotas haploides de la etapa (b);

(iii) una tercera población de células eucariotas haploides de tipo de apareamiento opuesto al de la segunda población de células eucariotas haploides, en el que la tercera población de células eucariotas haploides comprende una pluralidad de primeros miembros de un conjunto de vectores, comprendiendo dichos primeros miembros primeros polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una primera variante de cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular; y

(iv) una cuarta población de células eucariotas haploides de tipo de apareamiento opuesto al de la primera población de células eucariotas haploides, donde la cuarta población de células eucariotas haploides comprende una pluralidad de segundos miembros de un conjunto de vectores, comprendiendo dichos segundos miembros segundos polinucleótidos que codifican cada uno una segunda variante de cadena del polipéptido multi-cadena, en condiciones suficientes para permitir que células eucariotas de diferentes tipos de apareamiento se fusionen, produciendo una población de células eucariotas diploides; y

(i) repetir las etapas (d), (e) y (f).

28. Un método para detectar y aislar uno o más polipéptidos multi-cadena que muestran una actividad biológica de interés que comprende:

- (a) proporcionar una célula eucariota que es una célula animal o una célula fúngica en la que, con la expresión de un conjunto de vectores de presentación eucariota multi-cadena, la célula eucariota presenta un polipéptido multi-cadena sobre su superficie, donde una cadena del polipéptido multi-cadena está unida a la superficie celular por un anclaje de superficie celular;
- (b) cultivar la célula eucariota en condiciones suficientes para permitir la expresión del polipéptido multi-cadena;
- (c) poner en contacto las células con una molécula de interés; y
- (d) seleccionar y aislar estas células que muestran una interacción particular con la molécula de interés.

29. El método de la reivindicación 28, en el que se aísla una célula hospedadora que presenta el polipéptido multi-cadena que muestra la actividad biológica de interés y, opcionalmente, se somete a al menos un ciclo adicional de selección.

30. El método de la reivindicación 28, que comprende además explorar la biblioteca usando una exploración de presentación en fagos.

31. El método de la reivindicación 28, en el que la molécula de interés es una proteína y en el que preferiblemente la actividad biológica de interés es una interacción, más preferiblemente un interacción transitoria o una covalente, entre el polipéptido multi-cadena y otra especie molecular y comprende una asociación no covalente entre las especies moleculares.

32. Un método para transferir secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido multi-cadena biológicamente activo entre un vector de presentación en fagos y un vector de presentación eucariota que comprende:

- (a) obtener un vector de presentación en fagos que comprende:
 - (i) un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera cadena del polipéptido multi-cadena biológicamente activo, donde la primera cadena está unida a un anclaje de superficie celular y
 - (ii) un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multi-cadena, donde el vector de presentación en fagos es funcional en una célula hospedadora bacteriana para dirigir la expresión de las cadenas del polipéptido multi-cadena y donde las cadenas del polipéptido multi-cadena se asocian de tal forma que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de un fago que comprende el vector de presentación en fago y la propagación en la célula hospedadora bacteriana; y
- (b) insertar el primer y segundo polinucleótido que codifica las cadenas del polipéptido multi-cadena en el primer y segundo miembro de un conjunto de vectores de presentación eucariota, donde el conjunto de vectores de presentación eucariota es funcional en una célula hospedadora eucariota que es una célula animal o una célula fúngica para dirigir la expresión y secreción de las cadenas del polipéptido multi-cadena y donde la primera cadena del polipéptido multi-cadena se une a la superficie celular por el anclaje de superficie celular y las cadenas del polipéptido multi-cadena se asocian de tal forma que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula hospedadora eucariota.

33. Un método para transferir secuencias de ácido nucleico que codifican un Fab biológicamente activo entre un vector de presentación en fago y un vector de presentación eucariota que comprende:

- (a) obtener un vector de presentación en fago que comprende:
 - (i) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende las regiones V_H y CH1 de una cadena pesada de Ig unidas a un anclaje de superficie celular y
 - (ii) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende una cadena ligera de Ig,
 en el que el vector de presentación en fago es funcional en una célula hospedadora bacteriana para dirigir la expresión del primer y segundo polipéptido y donde los polipéptidos se asocian de tal forma que la actividad biológica del Fab se muestra en la superficie de un fago transfectado con el vector de presentación en fago y propagación en la célula hospedadora bacteriana; y

- (b) insertar el primer y segundo polinucleótido que codifican el primer y segundo polipéptido en miembros de un conjunto de vectores de presentación eucariota, donde el conjunto de vectores de presentación eucariota es funcional en una célula hospedadora de levadura para dirigir la expresión y secreción del primer y segundo polipéptido, donde el primer polipéptido del Fab se une a la superficie de la célula de levadura por el anclaje de superficie celular y los polipéptidos se asocian de tal forma que la actividad biológica del Fab se muestra en la superficie de la célula hospedadora de levadura.

34. El método de la reivindicación 33 ó 34, en el que la etapa de transferencia (b) comprende una técnica de transferencia genética seleccionada entre el grupo que consiste en digestión por restricción, amplificación por PCR, recombinación homóloga y combinaciones de tales técnicas.

35. Una célula hospedadora eucariota que es una célula animal o célula fúngica que comprende un conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende:

- (a) un primer miembro del conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular, donde la secuencia de aminoácidos del anclaje de superficie celular no tiene origen natural con la secuencia de aminoácidos del polipéptido con la que se fusiona; y
- (b) un segundo miembro del conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multi-cadena;

en la que el conjunto de vectores es funcional en una célula hospedadora eucariota para dirigir la expresión y secreción de las cadenas del polipéptido multi-cadena, la primera cadena del polipéptido multi-cadena está unida a la superficie de la célula hospedadora eucariota por el anclaje de superficie celular y donde las cadenas del polipéptido multi-cadena se asocian de tal forma que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula hospedadora eucariota.

36. La célula hospedadora eucariota de la reivindicación 35, en la que la célula animal es una célula de mamífero o una célula de insecto; y en la que la célula fúngica es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura haploide o diploide.

37. Un par de células eucariotas haploides que son células animales o células fúngicas que comprende:

- (a) una primera célula eucariota haploide que comprende un primer miembro del conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular donde la primera cadena del polipéptido multi-cadena se une a la superficie celular de una eucariota por el anclaje de superficie celular; y
- (b) una segunda célula eucariota haploide que comprende un segundo miembro del conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multi-cadena.

38. El par de células eucariotas haploides de la reivindicación 37, en el que la primera célula eucariota haploide y la segunda célula eucariota haploide son de tipo de apareamiento opuesto.

39. El par de células eucariotas haploides de la reivindicación 37 ó 38, en el que el polipéptido multi-cadena es un polipéptido de dos cadenas, seleccionado preferiblemente entre el grupo que consiste en fragmentos Fab de inmunoglobulina y los dominios extracelulares de receptores de células T, moléculas de MHC de clase I y moléculas de MHC de clase II; o el polipéptido multi-cadena es un polipéptido de cuatro cadenas, en el que el polipéptido de cuatro cadenas comprende dos de las primeras cadenas y dos de las segundas cadenas.

40. El par de células eucariotas haploides de cualquiera de las reivindicaciones 37-39, en el que el anclaje es una proteína de superficie celular de una célula eucariota.

41. Una biblioteca de células hospedadoras eucariotas que comprende una pluralidad de células diploides que son el producto de fusión de una pluralidad de pares de células hospedadoras eucariotas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37-40 y preferiblemente donde la pluralidad de células diploides presenta una población heterogénea de polipéptidos multi-cadena.

42. Una célula de levadura transformada con un conjunto de vectores de presentación heterólogo que comprende:

- (a) un primer miembro del conjunto de vectores de presentación que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a una anclaje de superficie celular funcional en levadura; y

- (b) un segundo miembro del conjunto de vectores de presentación que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multi-cadena;

en el que el conjunto de vectores es funcional en la célula de levadura para dirigir la expresión y secreción de las cadenas del polipéptido multi-cadena, la primera cadena del polipéptido multi-cadena está unida a la superficie de la célula de levadura por el anclaje de superficie celular y donde las cadenas del polipéptido multi-cadena se asocian de tal forma que la actividad biológica del polipéptido multi-cadena se muestra en la superficie de la célula de levadura.

43. Un par de células de levadura haploides, preferiblemente de tipo de apareamiento opuesto, que comprende:

- (a) una primera célula de levadura haploide que comprende un primer miembro de un conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera cadena de un polipéptido multi-cadena biológicamente activo unido a un anclaje de superficie celular funcional en levadura; y

- (b) una segunda célula de levadura haploide que comprende un segundo miembro del conjunto de vectores de presentación eucariota que comprende un segundo polinucleótido que codifica una segunda cadena del polipéptido multi-cadena.

44. Una biblioteca de presentación en levadura que comprende una población de células de levadura, comprendiendo dichas células de levadura miembros de un conjunto de vectores de presentación eucariota y que presentan de forma colectiva una población heterogénea de al menos 10^8 polipéptidos multi-cadena.

45. Una biblioteca de presentación en levadura que comprende una pluralidad de células diploides que son el producto de fusión de una pluralidad de pares de células de levadura de acuerdo con la reivindicación 43, preferiblemente donde la pluralidad de células diploides presenta una población heterogénea de Fab.

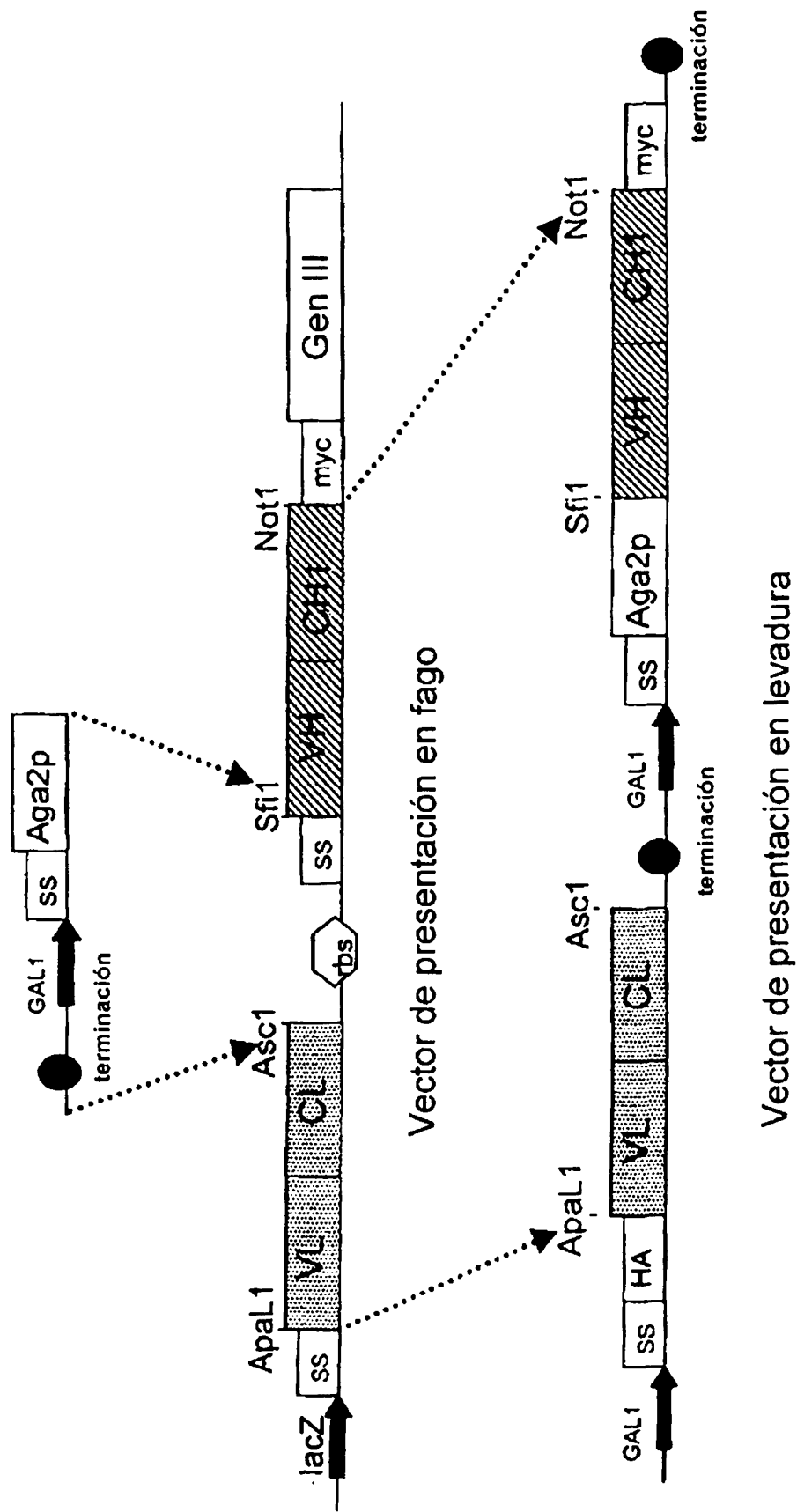


FIG. 1

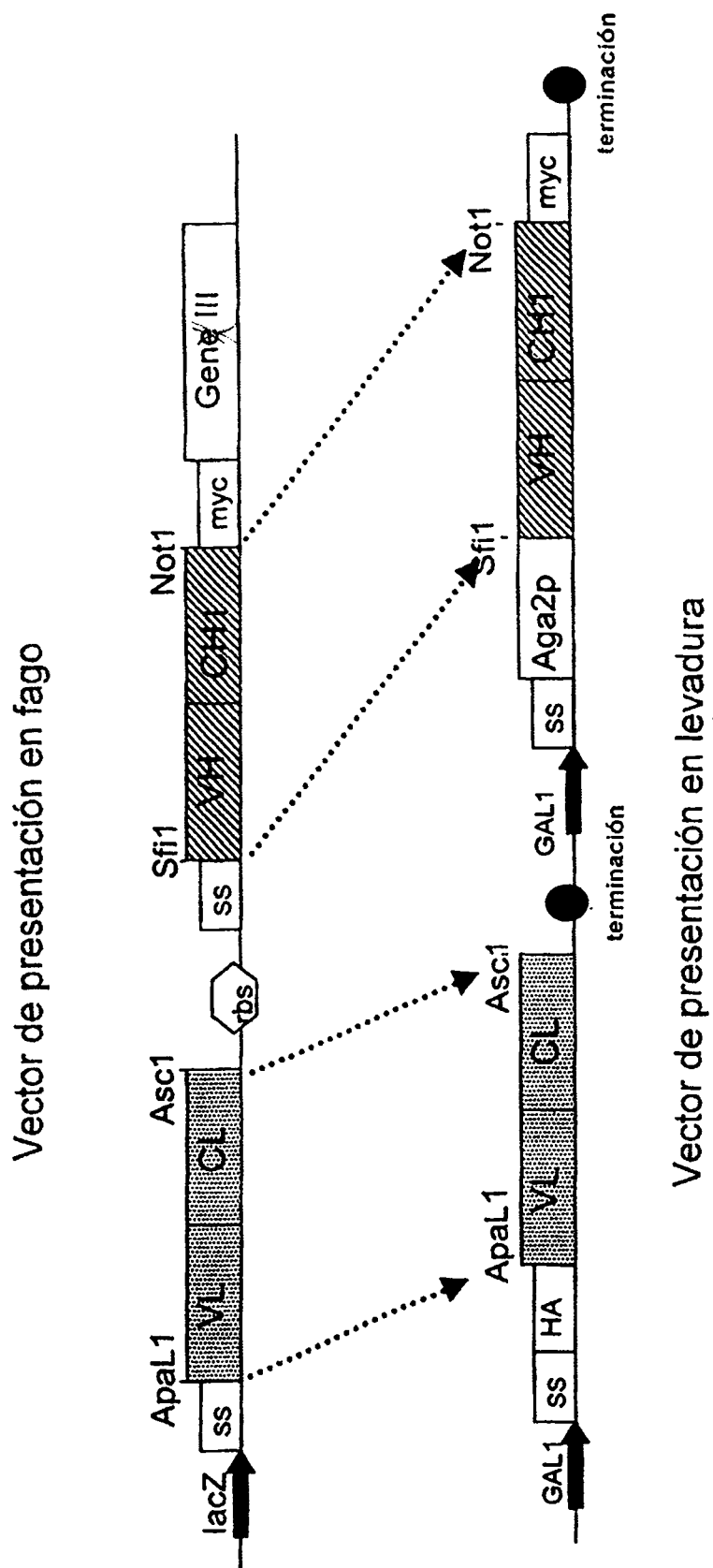


FIG. 2

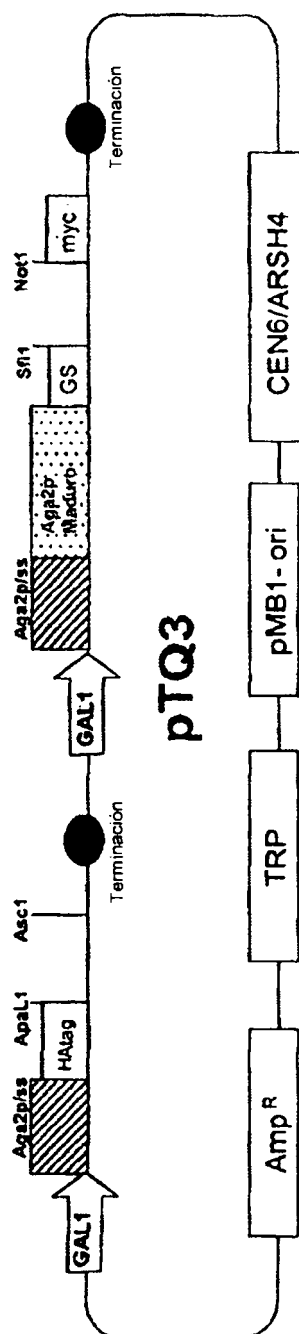


FIG. 3

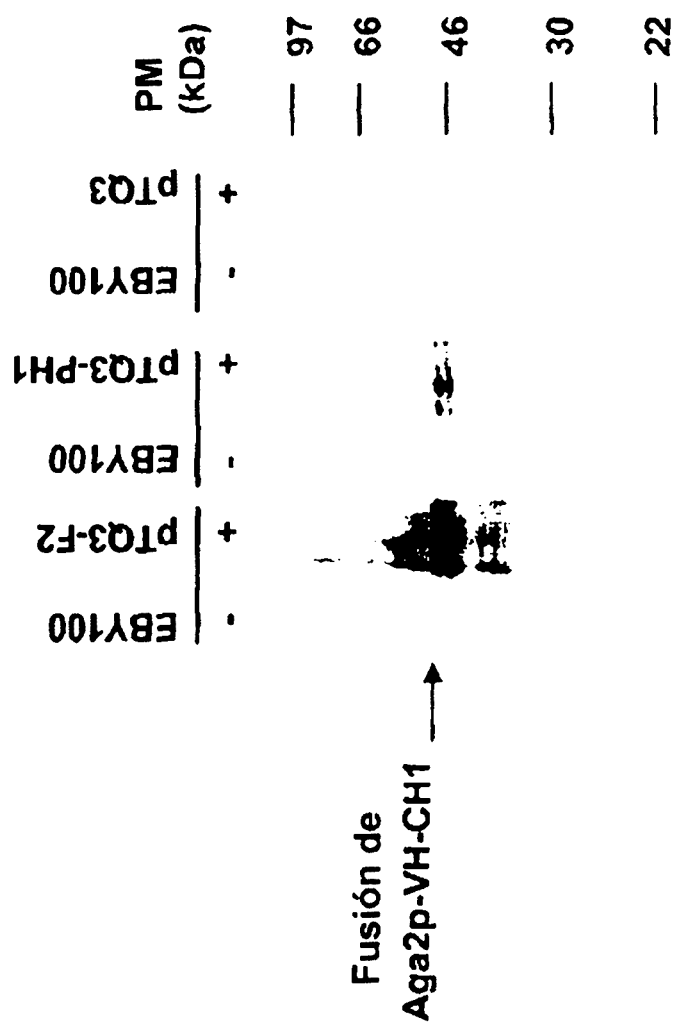


FIG. 4A



FIG. 4B

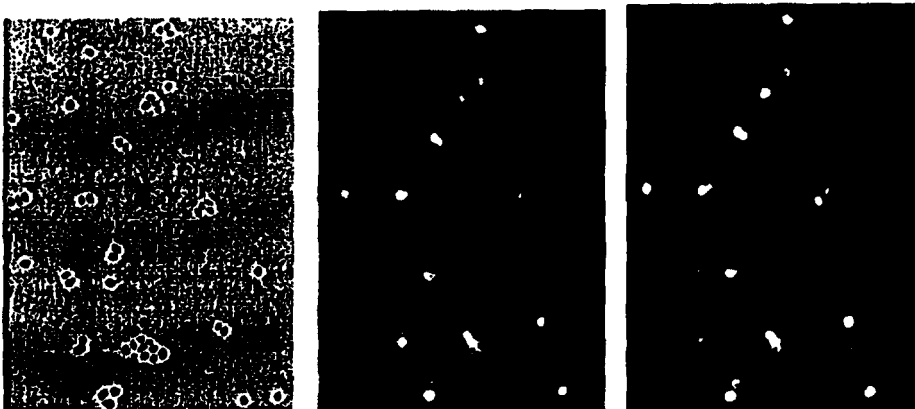


FIG. 4C

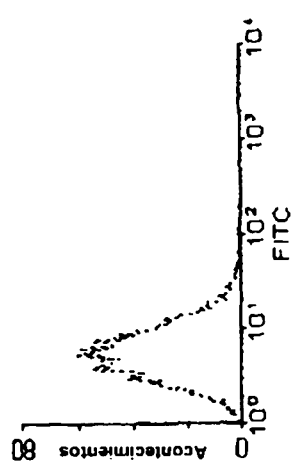


FIG. 5A

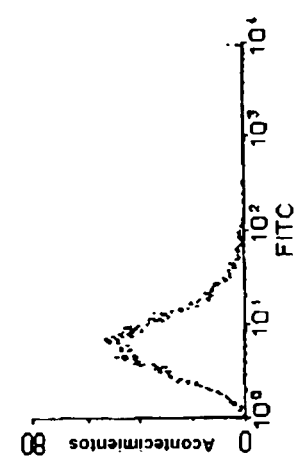


FIG. 5B

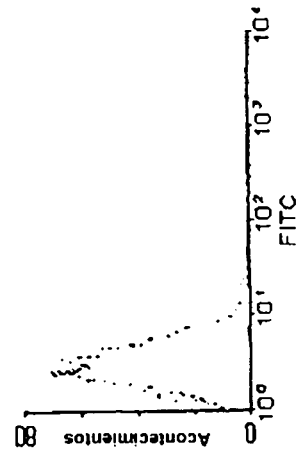
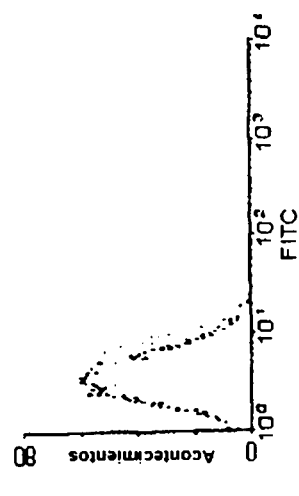
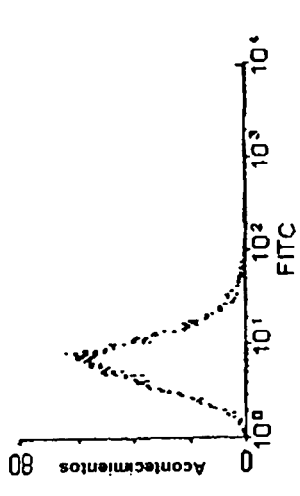
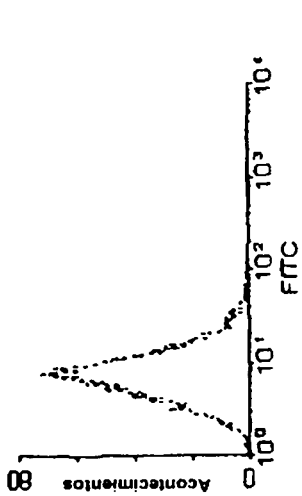


FIG. 5C



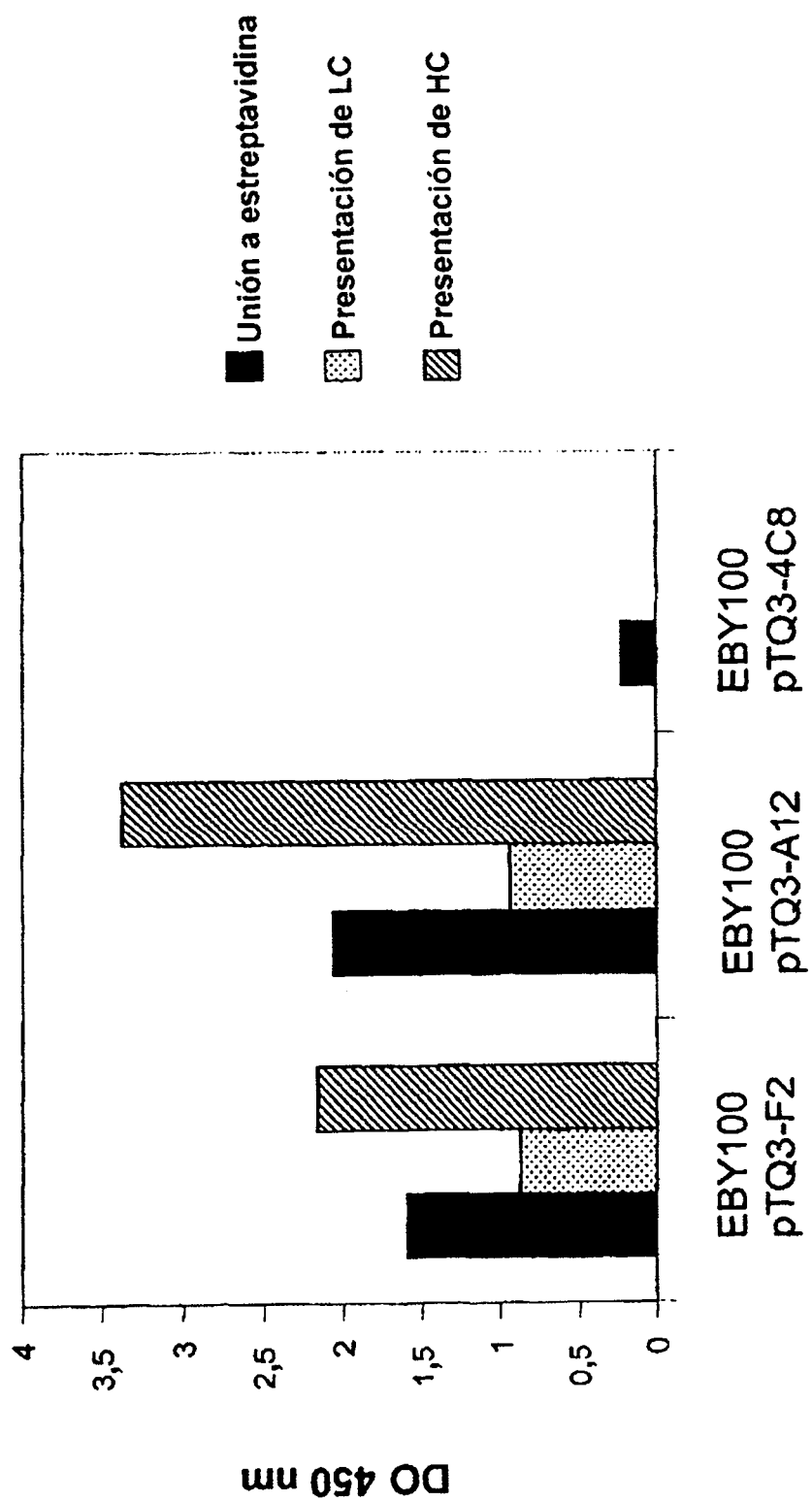


FIG. 6

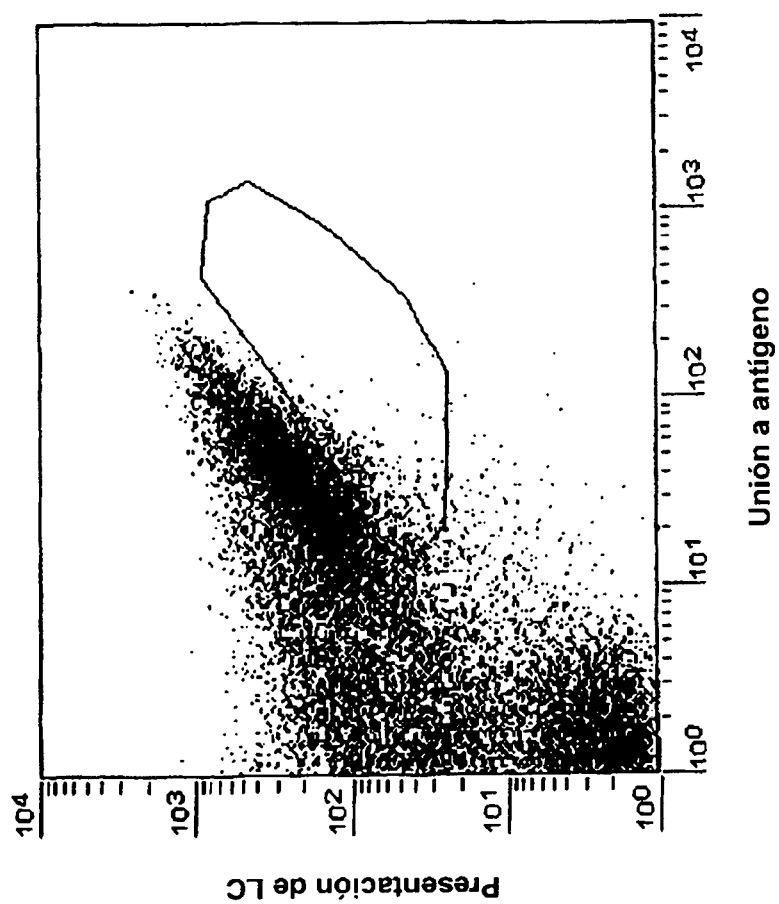


FIG. 7

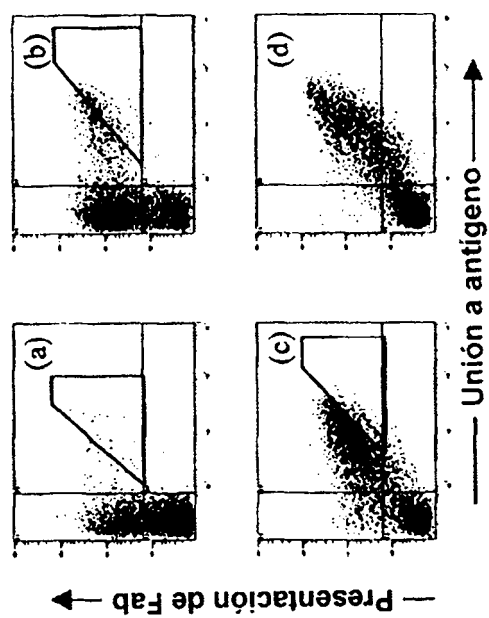


FIG. 8A

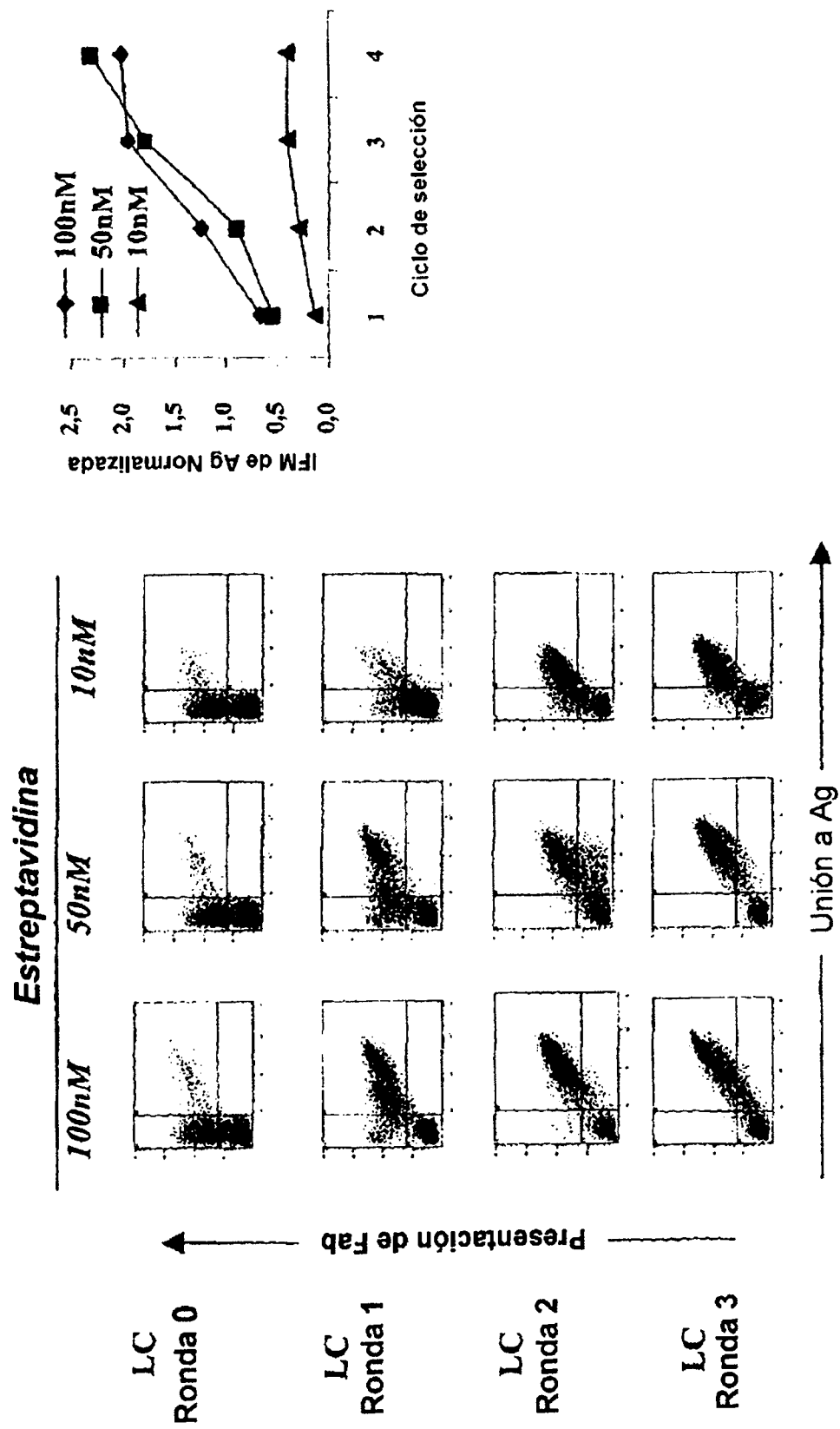


FIG. 8B

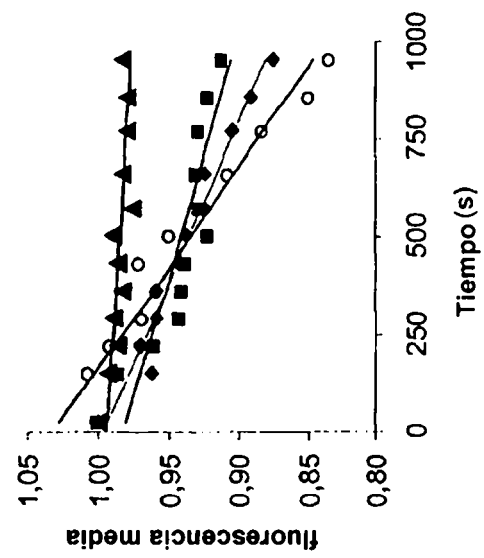


FIG. 8C

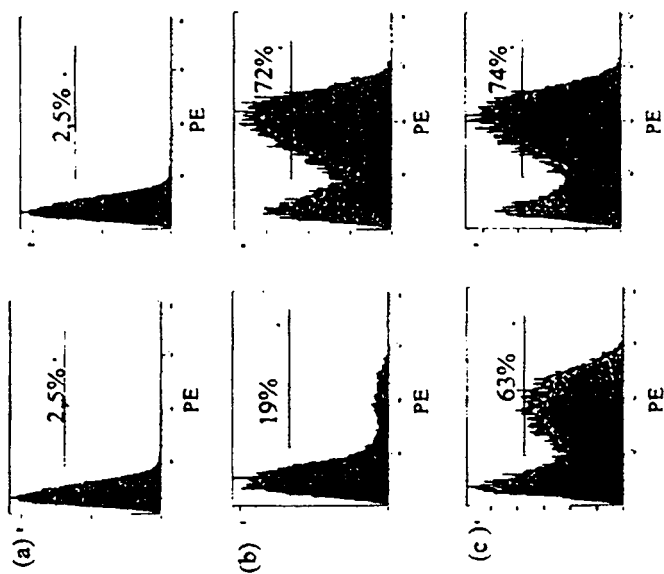


FIG. 8D

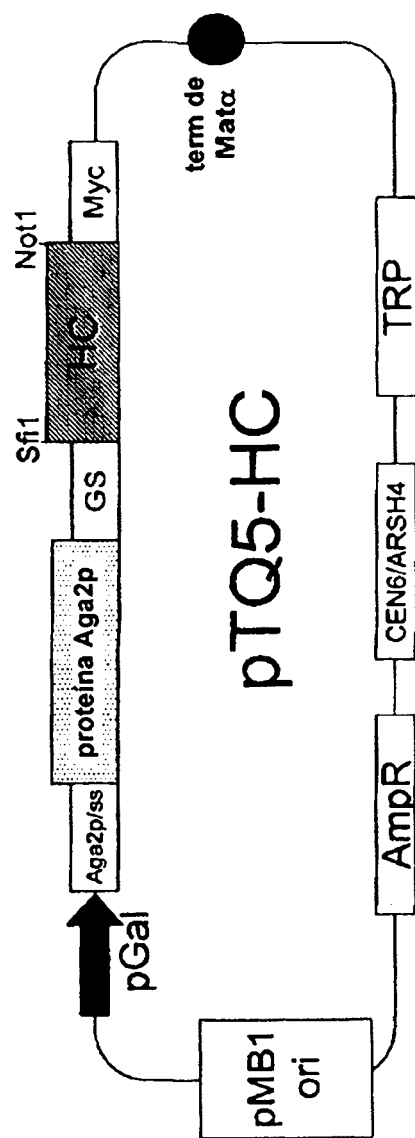


FIG. 9

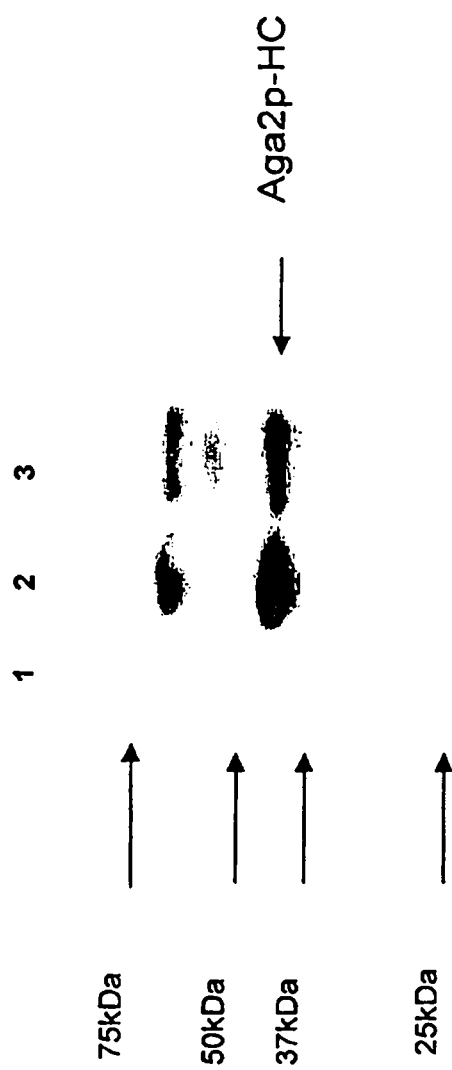


FIG. 10

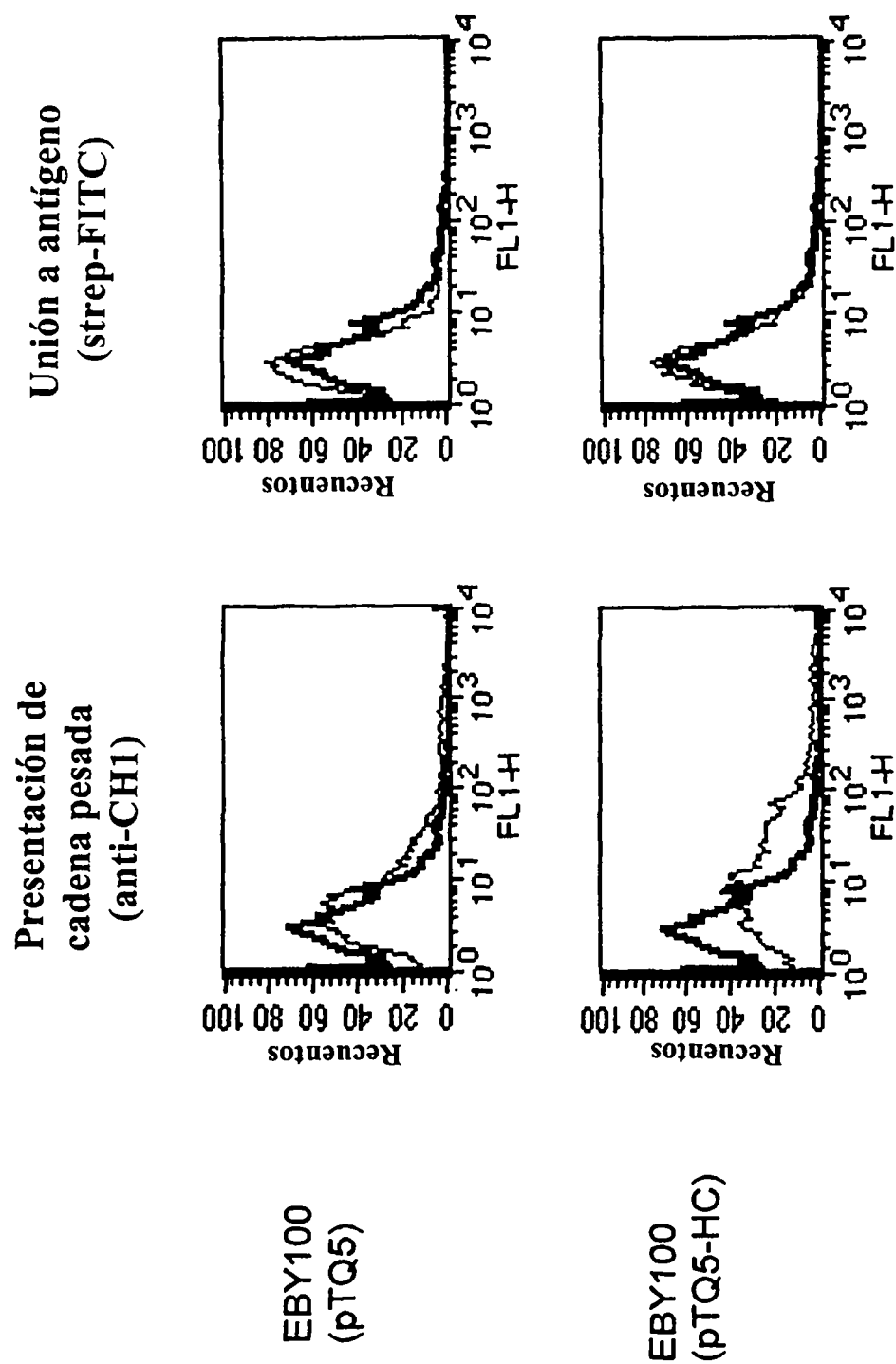


FIG. 11

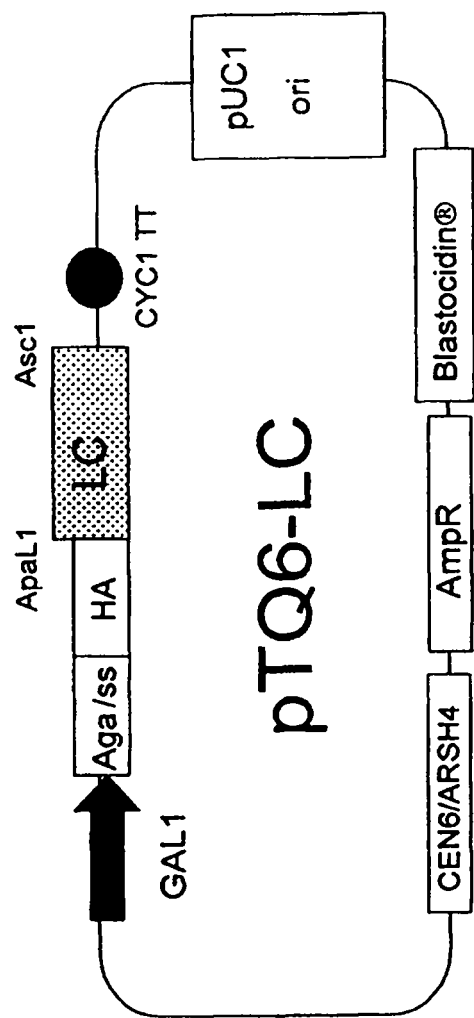


FIG. 12

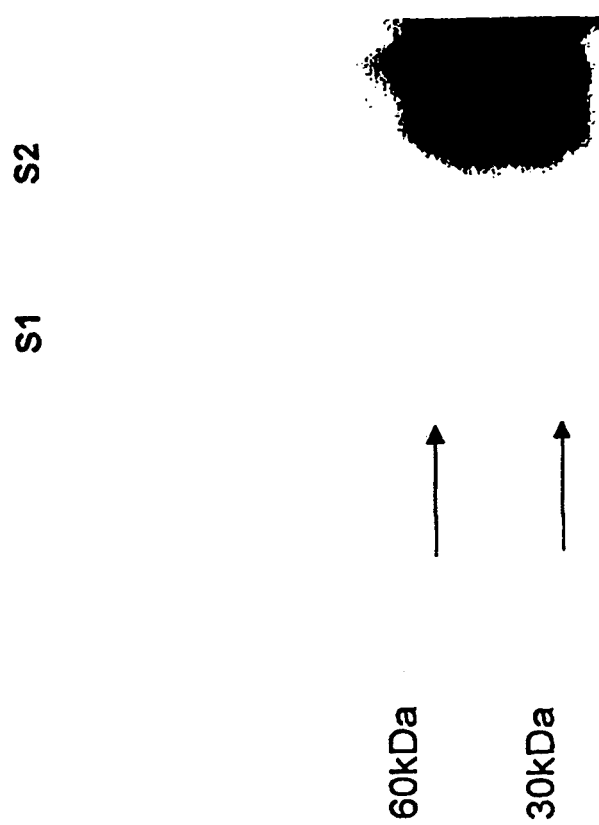


FIG. 13

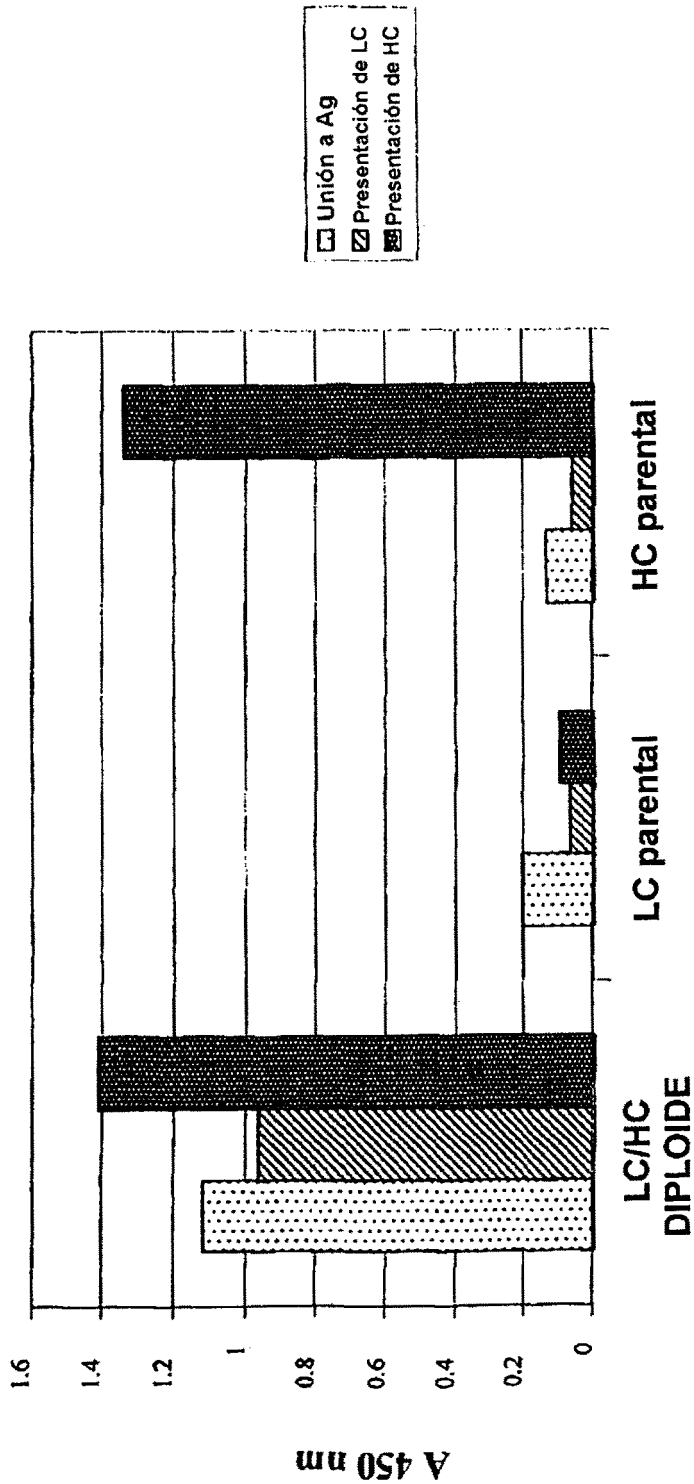
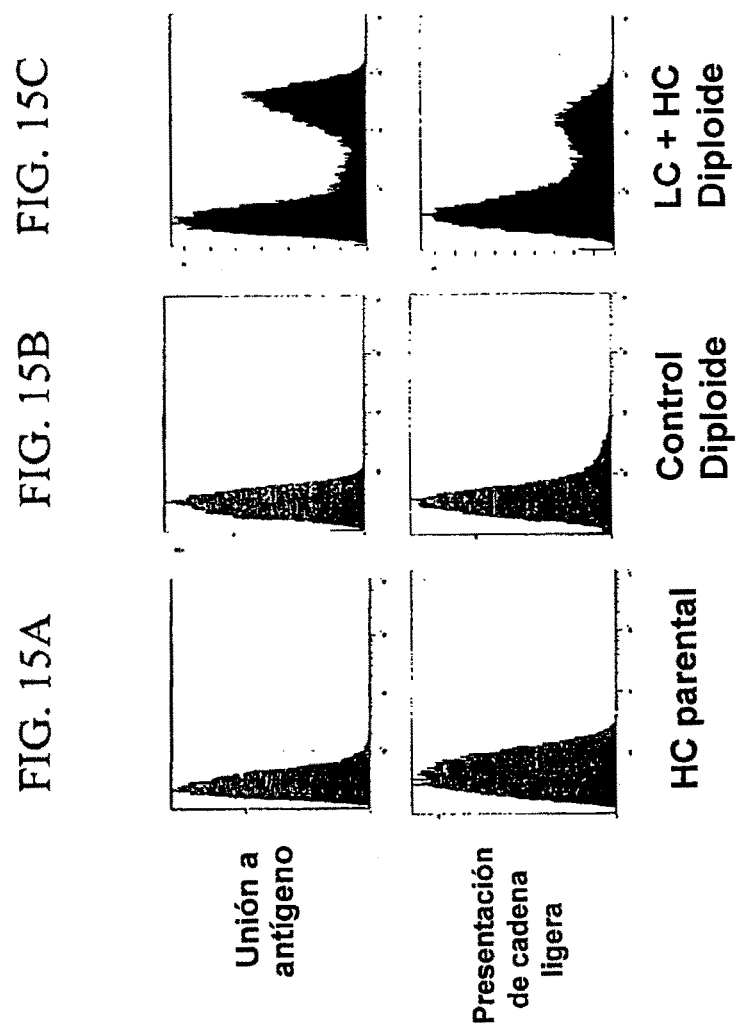


FIG. 14



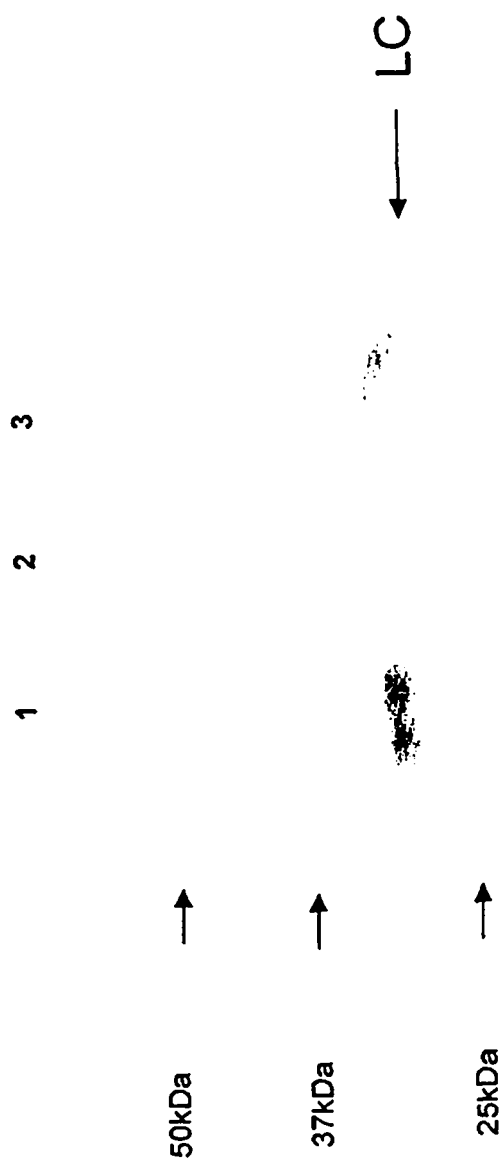


FIG. 16

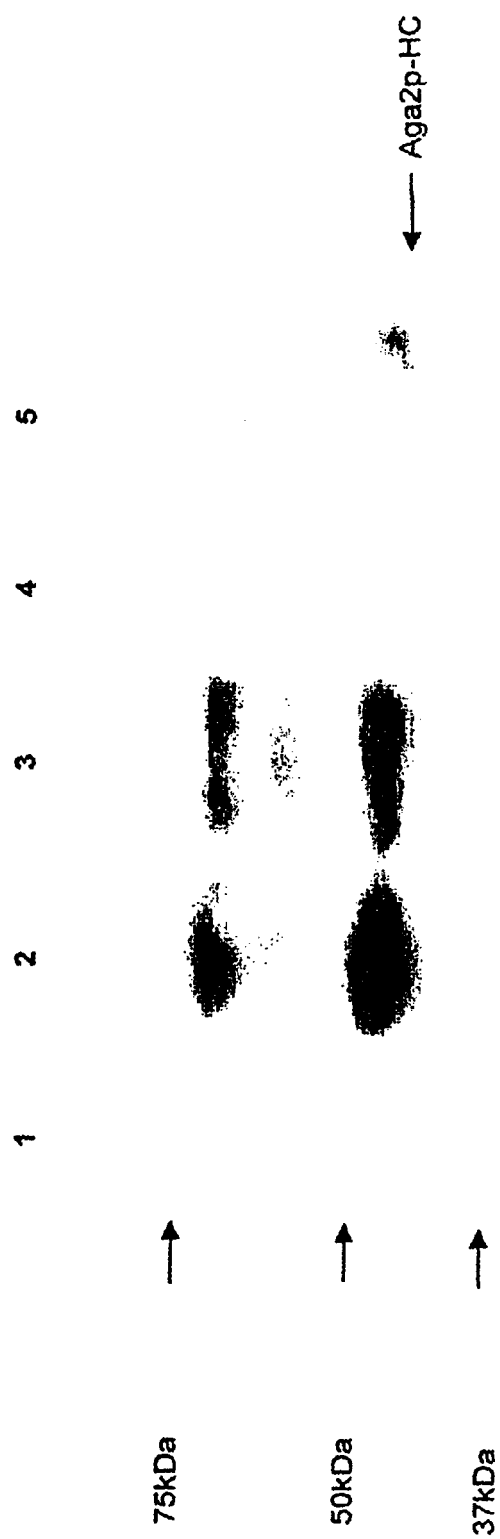


FIG. 17

FIG. 18C



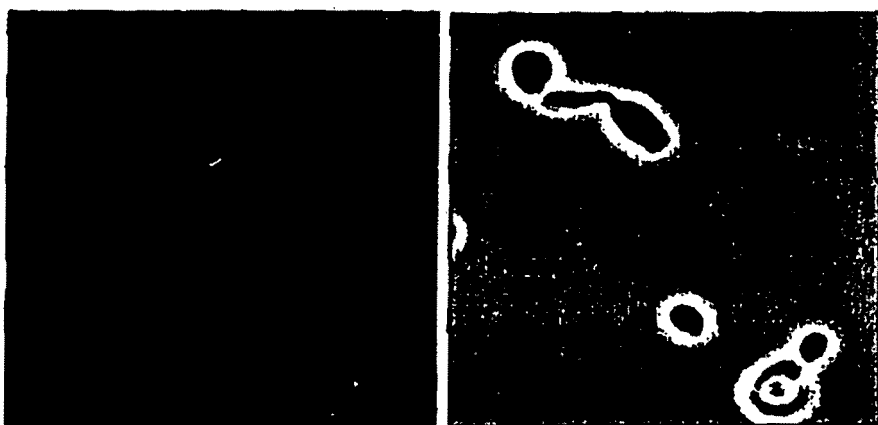
Unión a antígeno

FIG. 18B



Presentación
de HC

FIG. 18A



Presentación
de LC