

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 461**

21 Número de solicitud: 202230441

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C40B 40/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

24.05.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.12.2023

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

29.07.2024

Fecha de concesión:

18.12.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.12.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(50.00%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación,
Innovación y Transferencia - i2T, Camí de Vera,
s/n - Edificio 8G - Acceso A - Planta 3
46022 Valencia (Valencia) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.00%)**

72 Inventor/es:

PASCUAL-AHUIR GINER, María Desamparados

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la
página web de la OEPM para su descarga en
formato electrónico

54 Título: **LEVADURA Y PLÁSMIDO PARA LA EXPOSICIÓN DE PROTEÍNAS EN SUPERFICIE**

57 Resumen:

Levadura y plásmido para la exposición de proteínas
en superficie.

La presente invención se refiere a una levadura
recombinante caracterizada porque su genoma
comprende un promotor inducible por metabolito en
lugar del promotor nativo del gen AGA1, a un
plásmido que comprende (i) un promotor inducible por
metabolito operativamente unido la secuencia
nucleotídica codificante para una proteína de fusión
que comprende una proteína de interés, y al uso
combinado de dicha levadura y plásmido en un
método de Yeast Surface Display.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de
la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición
deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente
(art. 43 LP 24/2015).

ES 2 955 461 B2

DESCRIPCIÓN

Levadura y plásmido para la exposición de proteínas en superficie

5 La presente invención se refiere a una levadura recombinante, un plásmido, y el empleo de ambos en la metodología de exposición de proteínas en superficie de levaduras o *Yeast Surface Display* (YSD). Por lo tanto, la presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología, concretamente, en el campo de la ingeniería genética y en la elaboración de librerías de proteínas de interés.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La técnica de exposición en superficie de levadura o *Yeast Surface Display* (YSD) se ha convertido en una herramienta versátil para aplicaciones industriales y de
15 investigación. En 1997, K. Dane Wittrup y sus colegas describieron la primera construcción y procesos de selección de bibliotecas YSD (Boder ET, Wittrup KD. 1997. Nat Biotechnol. 15(6): 553-7), y desde entonces, el campo ha experimentado un crecimiento explosivo. En la actualidad se utiliza ampliamente para la selección de anticuerpos, la ingeniería de proteínas, en el estudio de interacciones proteína-ligando,
20 incluso en biocatálisis (Cherf GM, Cochran JR, 2015. Methods Mol Biol; 1319:155-75). El sistema de Wittrup se basa en la expresión regulada de una proteína abundante localizada en la pared celular, fusionada a una proteína concreta o librería. El resultado es el recubrimiento de la pared celular de levadura con la proteína a deseada, de forma que a cada levadura contiene el material genético que la produce. A partir del diseño
25 original de Wittrup se han desarrollado gran cantidad de plásmidos con distintas propiedades, que en la mayoría de los casos han complicado su utilización y restringido su empleo a experimentos concretos (Yi L. et al. 2013. Proc Natl Acad Sci USA. 110(8): 7229-34).

30 El sistema más utilizado es el que implica a las proteínas aglutininas de pared celular AGA1 y AGA2, como el descrito, por ejemplo, en la solicitud WO2010069913 A1. La solicitud US2010184136 A1 describe un método para mejorar la eficacia de la secreción de una proteína heteróloga en un sistema de expresión de levadura. El método comprende (i) transformar una levadura defectiva en el gen que codifica Gal2 con una
35 construcción génica recombinante que comprende un promotor inducible por galactosa, una secuencia señal de secreción y un gen que codifica una proteína heteróloga, y (ii)

cultivar la levadura transformada en condiciones que permitan el control del promotor inducible por galactosa. Yang, X. *et al.* 2019 (Microb Cell Fact 18:85. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1133-x>) describen una plataforma para la expresión de proteínas heterólogas en la superficie de *S. cerevisiae* con mayor eficacia que el sistema clásico de aglutinina Aga1p-Aga2p. La eficacia de esta plataforma se basa en emplear una única proteína de anclaje a la superficie (Aga1p) en lugar de dos, de forma que se evitan la fragilidad de los puentes disulfuro a las condiciones redox.

Sin embargo, ninguno de estos sistemas consigue una expresión de la proteína de interés en la superficie células óptima y en una cantidad suficiente para poder ser aplicado en un contexto industrial. Una mayor exposición es esencial para obtener resultados óptimos, y además estos deben de estar controlados para conseguir una mejor reproducibilidad de los resultados.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de optimizar, simplificar y flexibilizar un sistema para exposición de proteínas en la superficie celular, con el propósito de ofrecer un sistema controlado, escalable y que permita la automatización de cara a ser aplicado de forma industrial.

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han observado que mediante el reemplazo génico del promotor nativo que regula la expresión de AGA1 en levaduras por un promotor inducible por metabolito, como por ejemplo el promotor inducible por galactosa, la expresión de las proteínas recombinantes en la superficie de la levadura se incrementa con respecto a aquellas levaduras que presentan el promotor nativo (ver Ejemplos). Así, los inventores han desarrollado una levadura que, empleada en la técnica de exposición de proteínas en superficie de levadura o YSD (de sus siglas en inglés *Yeast Surface Display*), permite la optimización de la exposición en la superficie de la proteína de interés, superando así los inconvenientes de otros métodos existentes en el estado de la técnica.

Además, los inventores también han desarrollado un conjunto de plásmidos que permiten la co-expresión de dos proteínas de interés simultáneamente, la recuperación de dichas proteínas por tratamiento con proteasas y su purificación posterior mediante cromatografía de afinidad. Los plásmidos desarrollados permiten la co-transformación

de los mismos en una única levadura gracias a que contienen distintos marcadores de selección. Esta posibilidad de co-transformación aumenta las aplicaciones del sistema YDS. Por un lado, en aplicaciones de biocatálisis, puesto que permite introducir más de una proteína en superficie. Otros sistemas parecidos se basan en introducir sitios de anclaje en AGA2 y la producción externa de proteínas que reconocen estos sitios, pero esto complica mucho la eficiencia y reproducibilidad de las reacciones. En experimentos de cribado de librerías además es una ventaja porque se puede duplicar la representatividad de la librería, de forma que cada levadura contendría la información para dos proteínas expuestas en superficie.

En base a lo anterior, los inventores han desarrollado nuevos elementos, tales como las levaduras y los plásmidos arriba mencionados, que permiten la optimización del sistema YSD, y que serán descritos a continuación en detalle junto con todas sus realizaciones particulares.

Levadura de la invención, sus usos y método de obtención

Tal como se ha explicado anteriormente, las levaduras desarrolladas permiten la optimización de la exposición en la superficie de la proteína de interés, superando así los inconvenientes de otros métodos existentes en el estado de la técnica.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con una levadura recombinante, de aquí en adelante “levadura de la invención”, caracterizada porque su genoma comprende un promotor inducible por metabolito en lugar del promotor nativo del gen *AGA1*. Esto es, los inventores han reemplazado el promotor nativo que regula el gen *AGA1* por un promotor inducible por metabolito. De este modo, la expresión de la proteína AGA1 en la superficie de la levadura sólo se produce en presencia del metabolito inductor. Sin inducción la superficie de la levadura carece del complejo natural AGA1-AGA2, puesto que AGA1 no se está expresando, y aunque sí que exista AGA2 natural, no se formará el complejo en la superficie. Con esta estrategia se evita la formación de complejos naturales AGA1-AGA2 que competirían con los complejos de YSD que se han diseñado en la presente invención, y por lo tanto se aumenta la eficiencia del recubrimiento con las construcciones aquí descritas. Esto se comprobó por citometría de flujo con las tres cepas de levadura empleadas en los ejemplos (yK110, yK401 y yK501) demostrándose un incremento de exposición alrededor de 300% en

yK401, y entre 150- 250% en yK110 y yK501 (ver Ejemplos y Fig. 4).

La levadura de la invención puede ser, por ejemplo, cualquier levadura del género *Saccharomyces* ssp., como por ejemplo, sin limitar a, *Saccharomyces cerevisiae*, *S.*
 5 *arboricolus*, *S. bayanus*, *S. bulderi*, *S. cariocanus*, *S. cariocus*, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *boulardii*, *S. chevalieri*, *S. dairenensis*, *S. ellipsoideus*, *S. eubayanus*, *S. exiguus*, *S. florentinus*, *S. fragilis*, *S. kudriavzevii*, *S. martiniae*, *S. mikatae*, *S. monacensis*, *S. norbensis*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. spencerorum*, *S. turicensis*, *S. unisporus*, *S. uvarum*, y *S. zonatus*. No obstante, en otra realización particular, la
 10 levadura de la invención es *Saccharomyces cerevisiae*. Ejemplos de levaduras de la especie *S. cerevisiae* incluyen, sin limitar a, BY4741, W303, Fm17, M2n, MEL2, HR4 WL3, Y130, KA31 y AH22.

La levadura de la invención se caracteriza porque en su genoma el promotor nativo del
 15 gen *AGA1* ha sido reemplazado por un promotor inducible por metabolito. Las técnicas de ingeniería genética que permiten la manipulación del genoma y el reemplazo de una parte del genoma por otra, son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y cualquiera de ellas puede emplearse en el contexto de la presente invención. Así, ejemplos de dichas técnicas, incluyen, sin limitar a, recombinación homóloga,
 20 recombinación específica mediada por integrasas, y nucleasas como el sistema CRISP/Cas o “la nucleasa de actividad similar a activador de transcripción” o TALEN (de sus siglas en inglés *Transcription activator-like effector nuclease*).

El gen *AGA1* (Nombre descriptivo: a-AGglutinin ; Nombre sistemático: YNR044W; SGD
 25 ID: SG-S000005327; *Saccharomyces* Genomic Database), codifica para la proteína Agap1, siendo esta proteína Agap1 la subunidad de anclaje de la a-aglutinina de las células; es una proteína altamente O-glicosilada con una señal de secreción en el extremo N-terminal y con una señal para la adición de el anclaje de GPI a la pared celular en el extremo C-terminal, unido a la subunidad Aga2p de adhesión a través de
 30 dos puentes disulfuro. El gen *AGA1* comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 20 (*AGA1* YNR044W SGDID:S000005327, chrXIV:703699..705876).

SEQ ID NO: 20.

ATGACATTATCTTTTCGCTCATTTTACCTACCTGTTTACAATATTGTTGGGATTAACATAATATTG
 35 CCTTGGCATCTGATCCAGAAACGATTCTAGTGACGATAACCAAGACAAACGATGCAAATGGGGT

TGT TACA A C T A C A G T T T C A C C C G C G C T A G T C T C C A C A T C C A C T A T C G T T C A A G C T G G C A C T A C G
 A C A T T G T A T A C G A C T T G G T G T C C A T T G A C G G T A T C C A C T T C A T C T G C T G C C G A A A T A A G T C C T T
 C A A T A T C G T A C G C T A C T A C C C T A T C C A G A T T T A G T A C T T T G A C A T T A T C T A C A G A A G T C T G C T C
 C C A T G A G G C A T G T C C T T C G T C A T C G A C G T T G C C A A C C A C C A C C T T A T C T G T G A C T T C C A A G T T C
 5 A C T T C A T A T A T T T G C C C T A C T T G T C A C A C A A C C G C T A T C A G C T C A T T A T C C G A A G T A G G A A C T A
 C A A C C G T G G T A T C A T C C A G C G C C A T T G A A C C A T C A A G T G C C T C T A T A A T C T C A C C T G T C A C C T C
 T A C A C T T T C G A G T A C A A C A T C G T C C A A T C C A A C T A C T A C C T C C C T A A G T T C G A C A T C T A C A T C T
 C C A A G C T C T A C A T C T A C A T C T C C A A G C T C T A C A T C T A C C T C A T C A A G T T C G A C A T C T A C C T C A T
 C A A G T T C G A C A T C T A C C T C A T C A A G T T C G A C A T C T A C A T C T C C A A G T T C G A C A T C C A C A T C T T C
 10 A A G T T T G A C A T C C A C A T C T T C A A G T T C T A C A T C T A C A T C C C A A A G T T C T A C A T C T A C C T C A T C A
 A G T T C G A C A T C T A C A T C T C C A A G C T C T A C A T C T A C C T C A T C A A G T T C A A C A T C T A C A T C T C C A A
 G T T C T A A A T C T A C T T C T G C A A G C T C C A C T T C C A C T T C T T C A T A T T C A A C A T C T A C A T C C C C A A G
 T T T G A C T T C T T C A T C T C C A A C T T T G G C T T C C A C T T C T C C A A G T T C A A C A T C T A T T A G C T C T A C T
 T T T A C T G A T T C A A C T T C A T C C C T T G G C T C C T C T A T A G C A T C T T C A T C A A C G T C T G T G T C A T T A T
 15 A C A G C C C A T C C A C A C C T G T T T A C T C C G T C C C T T C G A C T T C G T C A A A T G T T G C A A C T C C T T C T A T
 G A C T T C T T C A A C T G T T G A A C A A C T G T T A G T T C A C A A G T T C G T C T G A A T A T A T C A C C A A A T C C
 T C A A T T T C T A C T A C T A T C C C A T C A T T T T C C A T G T C T A C A T A T T T C A C C A C T G T T A G T G G A G T C A
 C T A C A A T G T A T A C G A C A T G G T G T C C T T A T A G C T C T G A A T C T G A G A C T A G C A C A T T A A C C A G T A T
 G C A T G A A A C G G T T A C A A C A G A C G C T A C A G T C T G C A C T C A C G A G T C T T G C A T G C C C T C G C A G A C A
 20 A C A A G T T T G A T T A C A T C T T C T A T A A A A A T G T C C A C T A A A A C G T C G C A A C T T C T G T A A G C A C C T
 C A A C G G T T G A A T C C T C A T A T G C A T G C T C C A C A T G T G C T G A A A C G T C A C A C T C G T A T T C T T C C G T
 G C A A A C A G C T T C A T C A A G T T C T G T A A C A C A G C A G A C C A C A T C C A C A A A G A G T T G G G T A A G T T C A
 A T G A C A A C T T C G G A T G A A G A T T T C A A T A A G C A C G C T A C C G G T A A G T A T C A T G T A A C A T C T T C A G
 G T A C C T C A A C C A T T T C G A C T A G T G T A A G T G A A G C C A C G A G T A C A T C A A G C A T T G A C T C A G A A T C
 25 T C A A G A A C A A T C A T C A C A C T T A T T A T C G A C A T C G G T C C T T T C A T C C T C C T C C T T G T C T G C T A C A
 T T A T C C T C T G A C A G T A C T A T T T T G C T A T T C A G T T C T G T A T C A T C A C T A A G T G T C G A A C A G T C A C
 C A G T T A C C A C A C T T C A A A T T T C T T C A A C A T C A G A G A T T T T A C A A C C C A C T T C T T C C A C A G C T A T
 T G C T A C A A T A T C T G C C T C T A C A T C A T C A C T T T C C G C A A C A T C T A T C T C T A C A C C A T C T A C C T C T
 G T G G A A T C G A C T A T T G A A T C T T C A T C A T T G A C T C C G A C G G T A T C T T C T A T T T T C C T C T C A T C A T
 30 C A T C T G C T C C C T C T T C T C T A C A A A C A T C T G T T A C C A C T A C A G A A G T T T C C A C T A C T T C A A T C T C
 C A T A C A A T A C C A A C T T C A T C A A T G G T A A C A A T T A G C C A A T A T A T G G G C A G T G G A T C G C A A A C G
 C G T T T G C C A T T A G G A A A G T T G G T C T T C G C C A T C A T G G C A G T T G C T T G C A A T G T A A T T T T C A G T T
 A A

35 En la levadura de la invención, el promotor nativo del gen *AGA1* está reemplazado por un promotor inducible por metabolito. En la presente invención el término “promotor” o

“secuencia promotora” hace referencia a una secuencia de nucleótidos localizada en dirección 5' del inicio transcripcional de un gen, implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas encargadas de la transcripción de un gen en dirección 3'. Asimismo, en la presente invención un “promotor inducible” es aquel que

5 ha iniciado o aumentado el inicio de la transcripción del gen regulado en respuesta a un estímulo químico, ambiental o físico. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, sin limitar a, el promotor inducible por galactosa (PGAL1); promotor inducible por cobre (PCUP1), sistema de regulación por tetraciclina (Tet-on y Tet-off), promotor inducible con cianamida (PDDI2). Todos estos promotores son conocidos por el experto en la

10 materia y están disponibles comercialmente. En una realización particular de la levadura de la invención, el promotor inducible por metabolito es el promotor inducible por galactosa. En otra realización más particular de la levadura de la invención, la secuencia de nucleótidos del promotor inducible por galactosa comprende, o consiste en, la secuencia SEQ ID NO: 1.

15

SEQ ID NO: 1.

TCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACT
 TTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGC
 GGGTTACACAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCTTGGCATCCACTA
 20 AATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAAATA
 TTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGG
 GCACAAACAGGCAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGA
 TGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCT
 GCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTATTCCCC
 25 TACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTA
 AACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAACACCAGAACTTAGTT
 TCGA

La técnica de YSD comprende la exposición de una proteína de interés en la superficie

30 de la levadura. Para ello, es necesario expresar dentro de la levadura la proteína de interés. Así, para expresar la proteína de interés dentro de la levadura de la invención, se han diseñado un conjunto de plásmidos con una serie de características que permiten no solo expresar la proteína de interés, sino que además, posibilitan la co-transformación con otros plásmidos pudiendo expresar dos proteína de interés

35 simultáneamente, la recuperación de la proteína expuesta en la superficie de la

levadura, y la purificación de la proteína recuperada.

Por lo tanto, en otra realización particular, la levadura de la invención se caracteriza porque además comprende, uno o más plásmidos, en donde cada plásmido comprende:

- 5 (i) un promotor inducible por metabolito operativamente unido a la secuencia nucleotídica codificante para una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende en dirección N-terminal – C-terminal: (a) la región amino-terminal de la proteína Aga2, (b) una primera etiqueta de detección inmunológica, (c) una proteína de interés, (d) una segunda etiqueta de detección inmunológica, y (e) una etiqueta
10 de purificación de la proteína de interés;
- (ii) un promotor de amplio espectro operativamente unido a un marcador de selección, y
- (iii) un origen de replicación centromérico CEN/ARS.

- 15 En otra realización todavía más particular, el plásmido comprendido dentro de la levadura de la invención comprende, entre los componentes (b) y (c), una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

En otra realización preferida, la región amino-terminal de la proteína Aga2 es la
20 secuencia que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 31.

SEQ ID NO: 31:

MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSTLESTPYSLSTTTILANGKAMQGVFEYYKS
VTFVSNCGSHPTTSKGSPINTQYVF

25

En otra realización particular de la levadura de la invención, la primera etiqueta de detección inmunológica es un epítipo HA.

- 30 En otra realización más particular de la levadura de invención, el plásmido además comprende un sitio de reconocimiento de proteasas preferiblemente reconocido por la proteasa TEV o la proteasa THR.

En otra realización particular de la levadura de la invención, la proteína de interés se selecciona de la lista que consiste en:

- 35 - Anticuerpos en todas sus versiones, o fragmentos de los mismos, incluyendo

anticuerpos humanos (Wei Sun *et al.* Acta Pharm Sin B. 2019;9(5):960-972.), o versiones reducidas de estos, como scFv (Chao G *et al.* Nat Protoc. 2006;1(2):755-68).

- Enzimas con actividad degradativa, como por ejemplo las celulasas y hemicelulasas empleadas en la degradación de biomasa lignocelulósica y producción de etanol
5 (Tabañag I.D.F *et al.* Catalysts. 2018;8(3):94).

-Proteínas absorbentes de toxinas o contaminaciones alimentarias, como por ejemplo Silicateinas (Hongying Wang *et al.* ACS Omega. 2020; 5(13): 7555–7566).

-Enzimas con capacidad de aceptación o donación electrónica para procesos químicos de biocatálisis o biosensores (Pham ML. Polakovič M. Int J Biol Macromol. 2020;15(165)
10 835-841).

En otra realización particular de la levadura de la invención, la segunda etiqueta de detección inmunológica es un epítipo c-Myc.

15 En otra realización particular de la levadura de la invención, el marcador es un marcador de auxotrofia. En otra realización más particular, el marcador de auxotrofia es LEU, TRP, HIS o LEU.

En otra realización particular de la levadura de la invención, la etiqueta de purificación
20 de la proteína de interés es una cola de histidinas.

En otra realización particular de la levadura de la invención, el plásmido comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID
25 NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36), SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) o SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

30 En otra realización particular de la levadura de la invención, la levadura está caracterizada porque comprende dos plásmidos seleccionados de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12
35 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ

ID BO: 16 (PW36), SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) o SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

5 En otra realización particular de la levadura de la invención, uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 19 (pCTcon2), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 13 (PW33) y SEQ ID NO: 16 (PW36); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

10

En otra realización particular de la levadura de la invención uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 14 (PW34) y SEQ ID NO: 17 (PW37); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

15

En la presente invención, todas las realizaciones particulares descritas para la levadura de la invención se contemplan en solitario o en combinación con todas las anteriores. Asimismo, las realizaciones particulares referidas al plásmido comprendido dentro de la levadura de la invención serán descritas en detalle más adelante, en el que el plásmido es considerado otro aspecto inventivo de la presente invención, refiriéndonos a él como “el plásmido de la invención”.

20

25 Como entiende el experto en la materia, la levadura de la invención puede estar formando parte de una composición. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende la levadura de la invención.

25

La composición aquí descrita puede ser una composición líquida o sólida, y debe comprender todos aquellos compuestos o nutrientes que permitan el crecimiento, mantenimiento y/o el desarrollo de la levadura de la invención. En el contexto de la presente invención, el medio de cultivo en el que crece y se desarrolla la levadura se considera composición. Composiciones o medios de cultivos útiles en el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de levaduras son ampliamente conocidos por el experto en la materia y están disponibles comercialmente.

30

35

Los medios generales para crecer levaduras contienen una fuente de energía, como hidratos de carbono, y agar. Las levaduras crecen a temperatura ambiente, una presión de oxígeno de 1 atmósfera y a un pH ligeramente ácido, lo cual puede ayudar a que no
5 crezcan bacterias en este medio tan rico. Para mantener el material extracromosómico en forma de plásmido, a veces se añaden antibióticos a los medios de levaduras, muchas veces gentamicina, kanamicina, o cloranfenicol que inhiben el crecimiento de las levaduras sin plásmido. También puede hacerse selección positiva de plásmidos por complementación de rutas de biosíntesis de aminoácidos. El plásmido contiene la
10 información necesaria para completar una ruta de síntesis de aminoácidos (como leucina, triptófano, histidina etc...) que esta interrumpida en la cepa receptora. En este caso el medio de cultivo es preferiblemente un medio mínimo cumplimentado con todos los aminoácidos a excepción de aquel que se utiliza para la selección. En el sentido de la presente invención, se entiende por un "medio mínimo" un medio de cultivo acuoso
15 que contiene todos los sustratos (p. ej., fuente de carbono, sales minerales, oligoelementos, vitaminas) necesarios para el crecimiento de las células de levadura en forma disuelta, pero que al mismo tiempo no presenta sustancias constitutivas complejas o bien biomoléculas complejas (p. ej., extracto de levadura, peptona, triptona, etc.). El experto conoce del estado de la técnica un gran número de medios mínimos
20 para cultivar células de levadura. Algunos medios comunes y generalistas para crecer levaduras tienen un pH ácido como los medios Agar Sabouraud o Agar patata dextrosa. El medio más completo con el que se pueden crecer levaduras y el que se suele usar para crecer *S. cerevisiae* en el laboratorio es YEPD o YPD. En él se incluye extracto de levadura, normalmente un 1% en proporción masa/volumen con el agua, 2% de
25 peptona, 2% de glucosa o dextrosa como fuente de energía y agua doble destilada hasta el volumen deseado. Si quiere hacerse un medio sólido se le añade agar, en la concentración deseada, siendo lo más común poner el agar al 1 o 1,5%.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una librería de levaduras, de
30 aquí en adelante "librería de levaduras de la invención" que comprende una o más levaduras de la invención. Las librerías de levadura podrían ser librerías de anticuerpos sintéticos, tanto si se han generado a partir de material animal como si no. En el caso de proteínas con actividad enzimática, las librerías pueden contener varias versiones de una misma enzima, obtenidas a partir de secuencias descritas o bien a través de
35 métodos de evolución dirigida. Las librerías se generan o bien a partir de DNA sintético,

o a partir de librerías naturales en fagos, plásmidos, cósmidos, etc. obtenidos a partir del material genómico o de cDNAs. Según se ha descrito anteriormente, cada una de estas levaduras podría expresar hasta dos proteínas de interés.

- 5 La presente invención también contempla el empleo de la levadura de la invención en la técnica de exposición en superficie de levadura o YSD. Esta técnica es ampliamente conocida en el estado de la técnica, pudiendo consultarse en libros de texto y manuales de laboratorio, siendo su puesta en práctica rutina de laboratorio para el experto en la materia. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la levadura de la
10 invención en la técnica YSD.

El método de obtención de la levadura de la invención constituye otro aspecto de la presente invención. Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para obtener la levadura de la invención, de aquí en adelante "primer método de la invención",
15 que comprende una etapa (a) que comprende el reemplazamiento genético mediante recombinación homóloga del promotor natural del gen *AGA1* en una levadura por un promotor inducido por metabolito.

El gen *AGA1* así como el promotor que lo regula han sido descritos en párrafos
20 anteriores, y tanto su explicación como sus realizaciones particulares son aplicables al presente aspecto inventivo. De igual modo, promotores inducibles por metabolito también han sido descritos en el aspecto inventivo anterior y tanto su definición como sus realizaciones particulares son aplicables a este aspecto inventivo. Así, en otra realización particular del primer método de la invención, el promotor inducible por
25 metabolito es el promotor inducible por galactosa, donde, en otra realización más particular, la secuencia de nucleótidos del promotor inducible por galactosa comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

La levadura de la invención puede ser cualquier levadura del género *Saccharomyces*
30 ssp., como por ejemplo, sin limitar a, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. arboricolus*, *S. bayanus*, *S. bulderi*, *S. cariocanus*, *S. cariocus*, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *boulardii*, *S. chevalieri*, *S. dairenensis*, *S. ellipsoideus*, *S. eubayanus*, *S. exiguus*, *S. florentinus*, *S. fragilis*, *S. kudriavzevii*, *S. martiniae*, *S. mikatae*, *S. monacensis*, *S. norbensis*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. spencerorum*, *S. turicensis*, *S. unisporus*, *S. uvarum*, y *S.*
35 *zonatus*. No obstante, en otra realización particular, la levadura de la invención es

Saccharomyces cerevisiae. Ejemplos de levaduras de la especie *S. cerevisiae* incluyen, sin limitar a, BY4741, W303, Fm17, M2n, MEL2, HR4 WL3, YI30, KA31 y AH22.

En otra realización particular del primer método de la invención, el método comprende, además, una etapa (b) que comprende la transformación de la levadura obtenida en la etapa (a) con uno o más plásmidos, en donde cada plásmido comprende (i) un promotor inducible por metabolito operativamente unido a la secuencia nucleotídica codificante para una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende en dirección N-terminal – C-terminal: (a) la región amino-terminal de la proteína Aga2, (b) una primera etiqueta de detección inmunológica, (c) una proteína de interés, (d) una segunda etiqueta de detección inmunológica, y (e) una etiqueta de purificación de la proteína de interés; (ii) un promotor de amplio espectro operativamente unido a un marcador de selección, y (iii) un origen de replicación centromérico CEN/ARS.

En otra realización todavía más particular del primer método de la invención, el plásmido al que se refiere el párrafo anterior comprende, entre los componentes (b) y (c), una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

En otra realización preferida, la región amino-terminal de la proteína Aga2 es la secuencia que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 31.

En otra realización particular del primer método de la invención, la primera etiqueta de detección inmunológica es un epítipo HA.

En otra realización particular del primer método de la invención, el plásmido además comprende un sitio de reconocimiento de proteasas preferiblemente reconocido por la proteasa TEV o la proteasa THR.

En otra realización particular del primer método de la invención, la proteína de interés se selecciona de la lista que consiste en anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, enzimas con actividad degradativa, proteínas absorbentes de toxinas o contaminaciones alimentarias, enzimas con capacidad de aceptación o donación electrónica para procesos químicos de biocatálisis.

En otra realización particular del primer método de la invención, la segunda etiqueta de

detección inmunológica es un epítipo c-Myc.

En otra realización particular del primer método de la invención, el marcador es un
 5 marcador de auxotrofia donde, en otra realización más particular, el marcador de
 auxotrofia es LEU, TRP, HIS o LEU.

En otra realización particular del primer método de la invención, la etiqueta de
 purificación de la proteína de interés es una cola de histidinas.

10 En otra realización particular del primer método de la invención, el plásmido/los
 plásmidos de la etapa (b) es/son seleccionado/s de la lista que consiste en SEQ ID NO:
 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ
 ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29),
 SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO:
 15 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36),
 SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) o SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

En otra realización más particular del primer método de la invención, y en el caso de
 que la levadura sea transformada con dos plásmidos, uno de los plásmidos se
 20 selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 19 (pCTcon2), SEQ ID NO: 4 (PW24),
 SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 13 (PW33) y SEQ ID NO:
 16 (PW36); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3
 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ
 ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

25

Alternativamente a la realización particular anterior, en otra realización particular del
 primer método de la invención, y en el caso de que la levadura sea transformada con
 dos plásmidos, uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID
 NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 11 (PW31),
 30 SEQ ID NO: 14 (PW34) y SEQ ID NO: 17 (PW37); y el otro plásmido se selecciona de
 la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9
 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

En la presente invención, todas las realizaciones particulares descritas para el primer
 35 método de la invención se contemplan en solitario o en combinación con todas las

anteriores. Asimismo, las realizaciones particulares referidas al plásmido empleado en el primer método de la invención serán descritas en detalle a continuación, pues dicho plásmido es considerado otro aspecto inventivo de la presente invención, refiriéndonos a él como “el plásmido de la invención”.

5

Plásmido de la invención y sus usos

Tal como se ha descrito al comienzo de la presente descripción, los inventores han desarrollado un conjunto de plásmidos que permiten la co-expresión de dos proteínas
 10 de interés simultáneamente, la recuperación de dichas proteínas por tratamiento con proteasas y su purificación posterior mediante cromatografía de afinidad. Los plásmidos así desarrollados permiten la co-transformación de los mismos en una única levadura gracias a que contienen distintos marcadores de selección. Esta posibilidad de co-transformación aumenta las aplicaciones del sistema YDS. Por un lado, en aplicaciones
 15 de biocatálisis, puesto que permite introducir más de una proteína en superficie. Otros sistemas parecidos se basan en introducir sitios de anclaje en AGA2 y la producción externa de proteínas que reconocen estos sitios, pero esto complica mucho la eficiencia y reproducibilidad de las reacciones. En experimentos de cribado de librerías además es una ventaja porque se puede duplicar la representatividad de la librería, de forma que
 20 cada levadura contendría la información para dos proteínas expuestas en superficie. Los plásmidos desarrollados por los inventores en la presente invención serán descritos en detalle a continuación junto con todas sus realizaciones particulares.

Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un plásmido, de aquí en
 25 adelante “plásmido de la invención”, que comprende:

- (i) un promotor inducible por metabolito operativamente unido a la secuencia nucleotídica codificante para una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende en dirección N-terminal – C-terminal: (a) la región amino-terminal de la proteína Aga2, (b) una primera etiqueta de detección inmunológica, (c) una proteína
 30 de interés, (d) una segunda etiqueta de detección inmunológica, y (e) una etiqueta de purificación de la proteína de interés;
- (ii) un promotor de amplio espectro operativamente unido a un marcador de selección, y
- (iii) un origen de replicación centromérico CEN/ARS.

35

En la presente invención se entiende por “plásmido” una molécula de ADN extracromosómico circular o lineal que se replica y transcribe independiente del ADN cromosómico. Tal como se usa en la presente invención, los términos “plásmido” y “vector” (con capacidad de autoreplicación) son considerados equivalentes y pueden
5 emplearse indistintamente.

En la presente invención el plásmido de la invención se emplea para introducir y expresar un gen específico en una célula de interés, en particular, en una levadura. Por lo tanto, el plásmido de la invención se considera un vector de expresión. Los vectores
10 de expresión permiten la producción de grandes cantidades de ARN mensajero (ARNm) estable. Las proteínas codificadas por el plásmido de la invención son producidas mediante la maquinaria de transcripción y traducción de la célula una vez el vector está dentro de la misma. En una realización particular, el plásmido es un plásmido de amplio espectro de huésped, es decir, un plásmido que comprende los elementos genéticos
15 necesarios para ser funcional en múltiples células huésped.

En otra realización todavía más particular, el plásmido de la invención comprende, entre los componentes (b) y (c), una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

20 En otra realización preferida, la región amino-terminal de la proteína Aga2 es la secuencia que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 31

El plásmido de la invención comprende una primera etiqueta de detección inmunológica. En la presente invención se entiende por “etiqueta de detección inmunológica” a aquella
25 molécula, o epítipo, que es reconocida de forma específica por un anticuerpo, de manera que la proteína recombinante producida y que comprende dicho epítipo puede detectarse mediante técnicas inmunológicas. Dichas etiquetas, o “Tags” en inglés, son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y están disponibles comercialmente. Ejemplos de Tags o etiquetas incluyen, sin limitar a c-Myc (originado a partir del proto-oncogen c-myc), DYKDDDDK tag (también llamado Sigma's FLAG® tag, SEQ ID NO:
30 32), GFP (proteína verde fluorescente, de sus siglas en inglés *Green fluorescent protein*), Glu-Glu (etiqueta con la secuencia CEEEEYMPME, SEQ ID NO: 33, originalmente aislada del antígeno T mediano del virus del polio), GST (de sus siglas en inglés *glutathione S-transferase*), HA (hemaglutinina), 6xHIS (polihistidina o etiqueta
35 Hexa-histidina), mCherry (proteína fluorescente), S-Tag (epítipo derivado de los

- primeros 15 aminoácidos del extremo amino terminal de la ribonucleasa A pancreática), Strep-Tag (epítipo de 8 aminoácidos de secuencia WRHPQFGG, SEQ ID NO: 34), T7 (péptido de 11 aminoácidos de longitud codificado a partir de la secuencia líder del gen 10 del bacteriófago T7), thioredoxina, V5 (epítipo derivado de la subunidad alfa de la
- 5 ARN polimerasa del virus de parainfluenza de simio tipo 5), y VSV-G (epítipo derivado del virus de la estomatitis vesicular, SEQ ID NO: 35). En una realización particular del plásmido de la invención, la primera etiqueta de detección inmunológica es un epítipo HA.
- 10 Por otro lado, el plásmido de la invención también comprende un sitio de reconocimiento de proteasas. Este sitio permite que la proteína de interés producida pueda ser escindida o separada del resto de componentes de la proteína recombinante y ser recuperada mediante el tratamiento con proteasas para realizar posteriormente ensayos *in vitro*. Ejemplos de proteasas empleadas con esta finalidad incluyen, sin limitar a, proteasa
- 15 TEV (la secuencia de escisión es ENLYFQG, SEQ ID NO: 36), proteasa HRV3C (secuencia de escisión LFQGP, SEQ ID NO: 37), proteasa Trombina (secuencia de escisión LVPRGS, SEQ ID NO: 38), proteasa FactorXA (secuencia de escisión I(E/D)GR, SEQ ID NO: 39) y proteasa enteroquinasa (secuencia de escisión DDDDK, SEQ ID NO: 40). En una realización particular del plásmido de la invención, el sitio de
- 20 reconocimiento de proteasas es reconocido por la proteasa TEV o la proteasa THROMBIN (THR).

El plásmido de la invención también comprende una proteína de interés. Ejemplos de proteínas de interés incluyen, sin limitar a, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos

25 (SdAb, scFv, etc...), enzimas con actividad degradativa, proteínas absorbentes de toxinas o contaminaciones alimentarias, enzimas con capacidad de aceptación o donación electrónica para procesos químicos de biocatálisis.

Otro de los elementos del plásmido de la invención es una segunda etiqueta de detección inmunológica. El término “etiqueta de detección inmunológica” ha sido

30 definido previamente, así como ejemplos de la misma. Gracias a la segunda etiqueta de detección inmunológica se puede comprobar la integridad de la proteína expuesta en superficie. En otra realización particular del plásmido de la invención, la segunda etiqueta de detección inmunológica es un epítipo c-Myc.

35

En otra realización particular, el plásmido de la invención también comprende en su extremo c-terminal una secuencia de nucleótidos que codifica una cola de histidinas y que permite la purificación de la proteína de interés una vez escindida. Como entiende en el experto en la materia, cualquier secuencia de nucleótidos que codifique una etiqueta de purificación puede emplearse en el contexto de la presente invención. Ejemplos de etiquetas de purificación incluyen, sin limitar a, His-tag (polihistidinas), GTS Tag (Glutathion S-transferasa), MBP Tag (proteína de unión de maltosa), CBP Tag (péptido de unión a calmodulina), y tag basados en estreptavidine/Biotina [BCCP(péptido señal de biotinylación)+biotina].

10

El plásmido de la invención también comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección. Este marcador de selección permite identificar a la célula que comprende el plásmido de la invención frente a otras que no lo han incorporado. En la presente invención, un "marcador de selección", "gen marcador de selección" o "gen indicador" incluye cualquier gen que confiere un fenotipo a una célula en el que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de las células que se transfectan con una secuencia de nucleótidos o plásmido como la descrita en el presente documento. Los marcadores adecuados pueden seleccionarse de marcadores que confieren resistencia antibiótica, que introducen un nuevo rasgo metabólico o que permiten selección visual. Como ejemplos de genes marcadores de selección se incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos (tales como nptII que fosforila neomicina y canamicina, o hpt, que higromicina fosforilante, o genes que confieren resistencia a, por ejemplo, bleomicina, estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, gentamicina, geneticina (G418), espectinomycin o blasticidina), o genes que proporcionan un rasgo metabólico. La expresión de genes marcadores visuales da como resultado la formación de color (por ejemplo 13-glucuronidasa, GUS o 13-galactosidasa con sus sustratos de color, por ejemplo X-Gal), luminiscencia (tal como el sistema luciferina/luciferasa) o fluorescencia (Proteína Fluorescente Verde, GFP, y derivados de los mismos). Esta lista solo representa una pequeña cantidad de marcadores posibles. El experto está familiarizado con dichos marcadores. Dependiendo del organismo y del procedimiento de selección se prefieren diferentes marcadores. Si se desea, los marcadores genéticos pueden ser eliminados de la célula huésped en una etapa posterior. En una realización particular, el marcador de selección es un marcador de auxotrofia. Cualquier marcador de auxotrofia puede emplearse en el contexto de la presente invención. Dichos marcadores son ampliamente conocidos por el experto en

35

la materia y están disponibles comercialmente. Ejemplos de marcadores de auxotrofia incluyen, sin limitar a, ADE1, ADE2, CAN1, HIS3, LEU2, LYS2, TRP1, TRP5, URA3, URA4, MET15. No obstante, en una realización más particular del plásmido de la invención, el marcador de auxotrofia es TRP, HIS o LEU, más preferiblemente TRP1, 5 HIS3 o LEU2.

En otra realización particular del plásmido de la invención, éste comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 10 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36), SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) o SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

15 Tal como se ha explicado al inicio de esta invención, el plásmido de la invención está diseñado para que pueda ser co-transformado con otros plásmidos, de forma que la célula, en particular una levadura, más en particular la levadura de la invención, pueda expresar dos proteínas de interés simultáneamente. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una pareja de plásmidos, de que aquí en adelante “pareja de 20 plásmidos de la invención”, en donde la pareja de plásmidos se selecciona del listado de plásmidos que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 25 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36), SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) o SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

En una realización particular de la pareja de plásmidos de la invención, uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 19 (pCTcon2), SEQ ID 30 NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 13 (PW33) y SEQ ID NO: 16 (PW36); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

35 En otra realización particular de la pareja de plásmidos de la invención, uno de los

plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 14 (PW34) y SEQ ID NO: 17 (PW37); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32),
 5 SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

Tanto el plásmido como la pareja de plásmidos de la invención pueden ser introducidos dentro de una célula. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula huésped, de aquí en adelante “célula huésped de la invención”, que comprende el
 10 plásmido de la invención, o la pareja de plásmidos de la invención. Ejemplos de células huésped adecuadas para albergar el plásmido o la pareja de plásmidos de la invención incluyen, sin limitar a, células de mamíferos, plantas, insectos, de levaduras/hongos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin limitar a, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y
 15 *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de insectos incluyen, sin limitar a, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales
 20 (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), y células CHO (Chinese Hamster Ovary). En una realización particular de la célula huésped de la invención, la célula huésped es una célula de levadura. Células de levadura incluyen, sin limitar a
 25 levaduras del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida* y *Yarrowia*, y cualquiera de ellas puede emplearse como células huésped de la invención. En una realización más particular, la célula huésped es *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis glabrata*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula*
 30 *graminis*, *Saccharomyces pastorianus*, *Candida tropicalis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida glabrata*, *Torulaspora delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*, *Scheffersomyces stipites*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida albicans*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Clavispora lusitaniae*, o *Candida auris*. No obstante, en otra realización todavía más particular, la
 35 célula huésped de la invención es *Saccharomyces cerevisiae*. Ejemplos de levaduras

de la especie *S. cerevisiae* incluyen, sin limitar a, BY4741, W303, Fm17, M2n, MEL2, HR4 WL3, YI30, KA31 y AH22.

Preferiblemente, esta célula huésped de la invención es deficiente en proteasas,
5 característica que mejora la estabilidad de la proteína de fusión expresada.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende la célula huésped de la invención.

10 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del plásmido de la invención, o de la pareja de plásmidos de la invención, para transformar o co-transformar una célula huésped, preferiblemente una levadura, en particular, la levadura de la invención.

15 Métodos para introducir construcciones génicas, vectores o plásmidos dentro de una célula son ampliamente conocidos por el experto en la materia y su empleo es práctica habitual en el laboratorio. El término "introducir" en el contexto de la presente invención hace referencia a la incorporación de una secuencia de nucleótidos en una célula mediante "transfección" o "transformación" o "transducción", donde la secuencia de
20 nucleótidos puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, ADN mitocondrial), o ser un replicón autónomo, o expresarse de forma transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). Como se usa en el presente documento, los términos "transformada", "transformada de modo estable" o "transgénica", con referencia a una célula, significan que la célula tiene una secuencia de nucleótidos no
25 nativa (heteróloga) integrada en su genoma, o en un plásmido episomal que se mantiene a través de múltiples generaciones.

Ejemplos de métodos para introducir construcciones génicas, vectores o plásmidos en células huésped incluyen, sin limitar a, electroporación; microinyección nuclear o
30 microinyección directa en células simples; fusión de protoplastos bacterianos con células intactas; uso de policationes, por ejemplo, polibreno o poliornitina; fusión de membrana con liposomas, transfección mediada por lipofectamina, o lipofección; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN; incubación con precipitación del ADN-fosfato de calcio; transfección mediada con DEAE-dextrano;
35 infección con ácidos nucleicos virales modificados; transferencia de ADN mediada por

Agrobacterium y similares.

Método de YSD de la invención

- 5 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para exponer una proteína de interés en la superficie de una levadura, de aquí en adelante, “segundo método de la invención”, que comprende:
- (i) Transformar la levadura de la invención con uno o más plásmidos de la invención, o con una pareja de plásmidos de la invención, y
 - 10 (ii) cultivar la levadura transformada en la etapa (i) en las condiciones adecuadas para la expresión de la/s proteína/s de interés en la superficie de la levadura.

Tanto la levadura, como el plásmido o la pareja de plásmidos de la invención han sido descritos en aspectos inventivos anteriores y tanto sus definiciones como sus realizaciones particulares son aplicables presente aspecto inventivo.

En una primera etapa [etapa (i)], el segundo método de la invención incluye transformar la levadura de la invención con uno o más plásmidos de la invención, o con una pareja de plásmidos de la invención. En el presente aspecto inventivo se entiende por

20 “transformar”, el procedimiento que comprende introducir una secuencia de nucleótidos dentro de la levadura de la invención. Ejemplos de métodos para introducir plásmidos, en levaduras incluyen, sin limitar a, transformación química con LiAc y PEG, electroporación, microinyección nuclear o microinyección directa en células simples; fusión de protoplastos bacterianos con células intactas; uso de policationes, por ejemplo,

25 polibreno o poliornitina; fusión de membrana con liposomas, transfección mediada por lipofectamina, o lipofección; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN; incubación con precipitación del ADN-fosfato de calcio; transfección mediada con DEAE-dextrano; infección con ácidos nucleicos virales modificados; y similares. En una realización particular del segundo método de la

30 invención, la transformación de la levadura en la etapa (i) se lleva a cabo mediante transformación química con LiAc y PEG.

En una segunda etapa [etapa (ii)], el segundo método de la invención comprende cultivar la levadura transformada en la etapa (i) en las condiciones adecuadas para la expresión

35 de la/s proteína/s de interés en la superficie de la levadura. Condiciones y medios de

cultivo para cultivar levaduras han sido explicados en un aspecto inventivo anterior, concretamente, para la levadura de la invención, y dichos medios y condiciones son aplicables al segundo método de la invención.

- 5 Tras la etapa (ii) del segundo método de la invención, se obtiene una levadura que comprende en su superficie la proteína de interés introducida con el plásmido de la invención. Ejemplos de proteínas de interés han sido citados previamente. Así, en una realización particular del segundo método de la invención, la proteína de interés se selecciona de la lista que consiste en anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (SdAb,
- 10 scFv, etc...), enzimas con actividad degradativa, proteínas absorbentes de toxinas o contaminaciones alimentarias, enzimas con capacidad de aceptación o donación electrónica para procesos químicos de biocatálisis.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Figura 1. Método de reemplazamiento de promotores utilizado para generar las cepas yK110, yK401, e yK501. Se generó mediante PCR un fragmento con el marcador de selección por complementación de auxotrofía con URA3 y flanqueado con secuencias homólogas para la recombinación con el promotor natural de AGA1.

20

Figura 2. Esquema de las construcciones de los plásmidos de la serie PW. A- Construcción con un sitio de reconocimiento de proteasas TEV o THR. B- Construcción con una etiqueta de poli-histidinas en zona N-terminal para purificación por columna de afinidad.

25

Figura 3. Mapa representativo de los plásmidos pW generados en la presente invención.

Figura 4. Porcentaje de aumento de células comprendiendo los plásmidos de la invención que expresan proteínas en superficie de levadura con éxito respecto a la cepa control EBY100.

30

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los

35 inventores, que ponen de manifiesto la utilidad de la levadura, el plásmido y los métodos

descritos en la invención.

I - MATERIAL y MÉTODOS

5 Cepas de levadura y condiciones de cultivo.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 1. Las cepas de levadura se cultivaron a 28 °C en medio de crecimiento completo (YPD) que contenía 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona bacteriológica y 2 % de dextrosa. Las cepas transformadas con plásmidos se crecieron en un medio de crecimiento sintético (SD) que contenía un 0,67 % de base nitrogenada de levadura, 50 mm de ácido succínico, pH 3 y un 2 % de dextrosa. Según las auxotrofías de cada cepa se añadió, adenina (0,025 g/litro), histidina (0,1 g/litro), leucina (0,1 g/litro), metionina (0,1 g/litro), triptófano (0,05 g/litro) o uracilo (0,025 g/litro). En el caso de la inducción de promotores controlados por GAL1, se sustituyó en la misma concentración la dextrosa por galactosa.

CEPA	DESCRIPCION	ORIGEN
BJ5465	MATa ura3-52 trp1 leu2-delta1 his3-delta200 pep4::HIS3 prb1-delta1.6R can1 GAL	ATCC https://www.atcc.org
BY4741 pep4::KAN	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pep4::KAN	EUROSCARF http://www.euroscarf.de
BY4741 prb1::KAN	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prb1::KAN	EUROSCARF http://www.euroscarf.de

Tabla 1. Cepas empleadas en la invención.

Construcción de cepas de exposición aumentada

Las cepas se han generado por reemplazamiento génico del promotor del gen natural de AGA1, de forma que en todos los casos su expresión pasa a estar controlada por un promotor inducible por galactosa (Figura 1). Se emplearon los cebadores GAL1-AGA1 FW y GAL1-AGA1 RV (Tabla 2).

Cebadores	SECUENCIA
GAL1-AGA1 Fw	GGATATTGCACGTTTCAAGTCAAAACGCGGCTGTAACATAATTTT CGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGA (SEQ ID NO: 21)
GAL1-AGA1 Rv	CAATATTGTGAACAGGTAGGTAAAATGAGCGAAAGATAATGTCAT GGGGGATCCACTAGTTCTAGAATCCG (SEQ ID NO: 22)

Tabla 2. Diseño de cebadores empleados para el reemplazo del promotor natural de AGA1 por un promotor inducible por Galactosa.

Mediante reacción de PCR, se amplificó, con los oligonucleótidos de la tabla 2, la región situada entre el promotor de URA3 y el promotor de GAL1 utilizando como molde el plásmido pAG306GAL-ccdB (Alberti S. *et al.* Yeast. 2007;24(10):913-919). Los cebadores contienen extremos homólogos a los colindantes del gen natural, por lo que mediante reemplazamiento génico se ha sustituido el promotor natural por el regulable (Figura 1). El reemplazamiento se realizó en tres tipos de cepas defectivas en sistemas de proteasas; BJ5465, BY4741 pep4::KAN y BY4741 prb1::KAN. La transformación se realizó por el método químico de LiAC/PEG (Gietz RD. *et al.* Nat Protoc. 2007;2(1):31-4). Los cultivos se crecieron durante toda la noche en agitación a 28°C hasta crecimiento exponencial en YPD, y se emplearon 10⁸ células para la transformación química, se seleccionó a los transformantes en placas de medio sintético sin uracilo.

Construcción de plásmidos.

Los plásmidos con distintas auxotrofías se generaron por recombinación homóloga del plásmido pCTcon2 (ADDGENE <https://www.addgene.org>) con productos de PCR obtenidos de los plásmidos p415-GPD y p413-GPD (Mumberg D. *et al.* Gene. 1995 Apr 14;156(1):119-22). La inserción de los sitios de reconocimiento de proteasas específicas se obtuvo mediante hibridación de oligonucleótidos, digestión y clonación sobre los plásmidos pCTcon2, PW22 y PW23, originando los plásmidos PW22-29. La adición de las 6 Histidinas para purificación se realizó por hibridación de oligonucleótidos y recombinación homóloga con el plásmido pCTcon2 y PW22-29, y originó el plásmido PW30-38. Todos los plásmidos obtenidos se comprobaron por secuenciación. En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos empleados en la construcción de los plásmidos de la invención.

OLIGONUCLEOTIDOS	SECUENCIA
F1ori1-F	GTGGACTCTTGTTCCAAACTGG (SEQ ID NO: 23)
PRS-marker	CGGCATCAGAGCAGATTGTA (SEQ ID NO: 24)
TEV Fw	CCCCCTGCAGGAAAATTTGTATTTTCAATCTCTGCAGGGGG (SEQ ID NO: 25)
TEV Rev	CCCCCTGCAGAGATTGAAAATACAAATTTTCCTGCAGGGGG (SEQ ID NO: 26)
THROMBIN Fw	CCCCCTGCAGTTGGTTCCAAGAGGTTCTCTGCAGGGGG (SEQ ID NO: 27)
THROMBIN Rv	CCCCCTGCAGAGAACCTCTTGAACCAACTGCAGGGGG (SEQ ID NO: 28)
HISF	GAACAAAAGCTTATTTCTGAAGAGGACTTGCACCACCACCACCAC TGACTCGAGATCTGATAACAACAGTGTAGATGTAA (SEQ ID NO: 29)
HISR	TTACATCTACACTGTTGTTATCAGATCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGG

	TGGTGCAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTTC (SEQ ID NO: 30)
--	--

Tabla 3 - Oligonucleótidos empleados para la construcción de los plásmidos de la serie PW.

Citometría de Flujo

5

Los plásmidos PW obtenidos y comprobados, se transformaron mediante método químico en las cepas de levadura de la invención y se seleccionaron mediante crecimiento en medio sintético con los aminoácidos correspondientes. Se indujo la exposición de proteína de superficie con crecimiento con galactosa durante 24 horas a 28°C. Se realizaron ensayos de citometría de flujo de aproximadamente 150.000 células de levadura empleando un citómetro de flujo MACSQuant de Milteny, y empleando como anticuerpos para la detección anti-HA de ratón como anticuerpo 1° (Fisher, Ref 11558113.), y anti-ratón FITC de conejo como anticuerpo 2° (Abcam, Ref.ab8517).

10

15 II- RESULTADOS

Obtención del set de Plásmidos PW

20

En la mayoría de los trabajos descritos se obtienen construcciones por modificaciones del plásmido pCTcon2 (con gen *TRP1*), que se emplea en la cepa EBY100 (MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 *ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL*) (Boder ET, Wittrup KD. Nat Biotechnol. 1997;15(6):553-7).

CEPA	PLASMIDO 1	PLASMIDO 2
YK110	pCTcon2, PW24, PW27, PW30, PW33, PW36	PW23, PW26, PW29, PW32, PW35, PW38
YK401	PW22, PW25, PW28, PW31, PW34, PW37	PW23, PW26, PW29, PW32, PW35, PW38
YK501	PW22, PW25, PW28, PW31, PW34, PW37	PW23, PW26, PW29, PW32, PW35, PW38

Tabla 5-Combinaciones de plásmidos posibles para co-transformación en las cepas de S.c. generadas en la invención.

25

Además, para tener la posibilidad de recuperación de la proteína expuesta se han introducido sitios de reconocimiento por proteasa TEV y THR. Esta modificación es muy importante porque permite la recuperación de las proteínas mediante tratamiento con proteasas, para realizar posteriormente ensayos *in vitro*. El sistema de recuperación

30

dependiente de proteasas TEV y THR puede combinarse con plásmidos distintos que contengan marcadores de selección diferentes, y así posteriormente tener la posibilidad de realizar una extracción selectiva de solo una proteína o de las dos.

- 5 También se han introducido 6 residuos HIS en la zona C-terminal de la proteína que permiten su purificación. Existen otras versiones que introducen estos residuos en la parte N-Terminal, pero ya D Wittrup señala la necesidad de controlar la completa expresión de las proteínas mediante epítomos Myc en la zona C-terminal. Las construcciones que contienen etiquetado en su zona N-terminal, no diferencian una
- 10 proteína fragmentada de una completa. Con la construcción de la presente invención, solo se podrían purificar proteínas que se han procesado correctamente y están completas. En la Figura 2 se muestra un esquema de las construcciones de los plásmidos de la serie PW.
- 15 Con todo esto se han generado un total de 17 plásmidos para exposición de proteínas en superficie de levadura que permiten la co-expresión de dos proteínas simultáneamente, la recuperación por tratamiento con proteasas y su purificación posterior mediante cromatografía de afinidad. Todas las construcciones se han comprobado por secuenciación y transformado en cepas de levadura de la invención.
- 20 En la figura 3 puede verse un mapa representativo de los plásmidos generados en la presente invención. La tabla 6 muestra un resumen de las características diferenciales de los plásmidos.

NOMBRE	TRP	HIS	LEU	TEV	THR	ETIQUETA POLIHIS
PW22		x				
PW23			x			
PW24	x			X		
PW25		x		X		
PW26			x	X		
PW27	x				X	
PW28		x			X	
PW29			x		X	
PW30	x					X
PW31		x				X
PW32			x			X
PW33	x			X		X
PW34		x		X		X
PW35			x	X		X
PW36	x				X	X
PW37		x			X	X
PW38			x		X	X

Tabla 6. Conjunto de plásmidos obtenidos mediante ingeniería genética con la información detallada de su marcador de selección, sitio de reconocimiento de proteasa añadido, y etiqueta para purificación.

5 Obtención de cepas de expresión mejorada en superficie de levadura

La característica a destacar de estas cepas es que se ha sustituido el promotor natural por un promotor regulado por Galactosa que presenta la secuencia SEQ ID NO: 1. Existe una cepa similar a yK110 generada en el laboratorio de Dane Wittrup, EBY100 (con genotipo MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL), pero en este caso se insertó una construcción de AGA1 regulado por Galactosa en la región génica correspondiente al gen *URA3*. La diferencia es importante, puesto que sin inducción la superficie ya se encuentra cubierta del complejo natural AGA1-AGA2, lo que reduce la posibilidad de exposición de proteínas después de la inducción. Esto se comprobó por citometría de flujo con las tres cepas demostrándose un incremento de exposición alrededor de 300% en yK401, y entre 150- 250% en yK110 y yK501. La eficiencia de exposición de proteína en superficie es un factor limitante en la aplicación de la técnica que hemos optimizado notablemente.

Los resultados del citómetro obtenido en experimentos independientes se muestran en la Figura 4. La cepa ya descrita en los trabajos de Wittrup consigue un porcentaje de células con YSD del 14.3% a las 24 horas de inducción, mientras que la cepa YK110 con un plásmido representativo del kit PW36 alcanza el 37.88%. En un experimento independiente se evaluaron los porcentajes de células YSD de las cepas YK401 e YK501, con plásmidos representativos de la colección generada, obteniendo los siguientes valores; EBY100+pCTcon2 7.65%, YK401+PW37 24.17%, YK401+PW38 18.76%, YK501+PW37 20.88%. Teniendo en cuenta los valores obtenidos se calculó el % de aumento de células que expresan proteínas en superficie de levadura con éxito (Fig. 4).

30

III – CONCLUSIÓN

La presente invención ofrece un set de plásmidos y cepas que mejora y flexibiliza los experimentos de exposición en superficie de levadura. La optimización del sistema es importante para la reproducibilidad de los procesos, ya que el objetivo final es el

35

escalado y la robotización de los experimentos. Los reactivos que se necesitan para llevar a cabo la exposición en superficie, extracción y purificación, son muy comunes en los laboratorios, se pueden adquirir en distintas compañías distribuidoras de productos de laboratorio, y por lo tanto son económicos y accesibles. El sistema aquí desarrollado

5 es sencillo y robusto, a la vez que la combinación de sus elementos permite la adaptación simple a los objetivos experimentales.

REIVINDICACIONES

1. Una levadura recombinante caracterizada porque su genoma comprende un promotor inducible por metabolito en lugar del promotor nativo del gen *AGA1*, en donde la
5 levadura pertenece al género *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Levadura según la reivindicación 1, en donde el promotor inducible por metabolito es el promotor inducible por galactosa.

10

3. Levadura según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la secuencia de nucleótidos del promotor inducible por galactosa comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.

15 4 Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque comprende, además, uno o más plásmidos, en donde cada plásmido comprende:

(i) un promotor inducible por metabolito operativamente unido a la secuencia nucleotídica codificante para una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende en dirección N-terminal – C-terminal: (a) la región amino-terminal de la
20 proteína Aga2, (b) una primera etiqueta de detección inmunológica, (c) una proteína de interés, (d) una segunda etiqueta de detección inmunológica, y (e) una etiqueta de purificación de la proteína de interés;

(ii) un promotor de amplio espectro operativamente unido a un marcador de selección, y

25 (iii) un origen de replicación centromérico CEN/ARS.

5. Levadura según la reivindicación 4, en donde la primera etiqueta de detección inmunológica es un epítipo HA.

30 6. Levadura según la reivindicación 4 o 5, en donde el plásmido además comprende un sitio de reconocimiento de proteasas preferiblemente reconocido por la proteasa TEV o la proteasa THR.

7. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la proteína de
35 interés se selecciona de la lista que consiste en un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una enzima con actividad degradativa, una proteína absorbente de toxinas

o contaminaciones alimentarias, una enzima con capacidad de aceptación o donación electrónica.

8. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la segunda
5 etiqueta de detección inmunológica es un epítipo c-Myc.

9. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde el marcador de selección es un marcador de auxotrofia.

10 10. Levadura según la reivindicación 9, en donde el marcador de auxotrofia es LEU, TRP, HIS o LEU.

11. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en donde la etiqueta de purificación de la proteína de interés es una cola de histidinas.

15

12. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde el plásmido comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ
20 ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36), SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) o SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

13. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, caracterizada porque
25 comprende dos plásmidos seleccionados de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36),
30 SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) y SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

14. Levadura según la reivindicación 13, en donde uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 19 (pCTcon2), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 13 (PW33) y SEQ ID NO: 16 (PW36); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ
35

ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

15. Levadura según la reivindicación 13, en donde uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 14 (PW34) y SEQ ID NO: 17 (PW37); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

10 16. Una composición que comprende una levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. Una librería de levaduras que comprende una levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

15

18. Uso de una levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la técnica de exposición en superficie de levadura (*Yeast Surface Display*).

19. Método para obtener una levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende una etapa (a) que comprende el reemplazamiento genético mediante recombinación homóloga del promotor natural del gen *AGA1* en una levadura por un promotor inducido por metabolito, en donde la levadura pertenece al género *Saccharomyces cerevisiae*.

25

20. Método según la reivindicación 19, en donde el promotor inducible por metabolito es el promotor inducible por galactosa.

21. Método según la reivindicación 20, en donde la secuencia de nucleótidos del promotor inducible por galactosa comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.

22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, que además comprende una etapa (b) que comprende la transformación de la levadura obtenida en la etapa (a) con uno o más plásmidos, en donde cada plásmido comprende,

35 (i) un promotor inducible por metabolito operativamente unido a la secuencia nucleotídica codificante para una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión

comprende en dirección N-terminal – C-terminal: (a) la región amino-terminal de la proteína Aga2, (b) una primera etiqueta de detección inmunológica, (c) una proteína de interés, (d) una segunda etiqueta de detección inmunológica, y (e) una etiqueta de purificación de la proteína de interés;

- 5 (ii) un promotor de amplio espectro operativamente unido a un marcador de selección, y
 (iii) un origen de replicación centromérico CEN/ARS.

23. Método según la reivindicación 22, en donde la primera etiqueta de detección
 10 inmunológica es un epítipo HA.

24. Método según la reivindicación 22 o 23, en donde el plásmido además comprende un sitio de reconocimiento de proteasas preferiblemente reconocido por la proteasa TEV o la proteasa THR.

15 25. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde la proteína de interés se selecciona de la lista que consiste en un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una enzima con actividad degradativa, una proteína absorbente de toxinas o contaminaciones alimentarias, una enzima con capacidad de aceptación o donación
 20 electrónica.

26. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en donde la segunda etiqueta de detección inmunológica es un epítipo c-Myc.

25 27. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en donde el marcador es un marcador de auxotrofia.

28. Método según la reivindicación 27, en donde el marcador de auxotrofia es LEU, TRP, HIS o LEU.

30 29. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, en donde la etiqueta de purificación de la proteína de interés es una cola de histidinas.

30. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, que además
 35 comprende una etapa (b) que comprende la transformación de la levadura obtenida en la etapa (a) con uno o más plásmidos, en donde el plásmido/los plásmidos es/son

seleccionado/s de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36), SEQ ID NO: 17 (PW37), SEQ ID NO: 18 (PW38) o SEQ ID NO: 19 (pCTcon2).

31. Método según la reivindicación 30, en donde uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 19 (pCTcon2), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 13 (PW33) y SEQ ID NO: 16 (PW36); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

32. Método según la reivindicación 31, en donde uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 14 (PW34) y SEQ ID NO: 17 (PW37); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

33. Un método para exponer una proteína de interés en la superficie de una levadura que comprende:

- (i) Transformar una levadura recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con uno o más plásmidos, donde cada plásmido comprende
 - (i) un promotor inducible por metabolito operativamente unido a la secuencia nucleotídica codificante para una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende en dirección N-terminal – C-terminal: (a) la región amino-terminal de la proteína Aga2, (b) una primera etiqueta de detección inmunológica, (c) una proteína de interés, (d) una segunda etiqueta de detección inmunológica, y (e) una etiqueta de purificación de la proteína de interés;
 - (ii) un promotor de amplio espectro operativamente unido a un marcador de selección, y
 - (iii) un origen de replicación centromérico CEN/ARS;
- y
- (ii) cultivar la levadura transformada en la etapa (i) en las condiciones adecuadas

para la expresión de la/s proteína/s de interés en la superficie de la levadura.

34. Método según la reivindicación 33, en donde la primera etiqueta de detección inmunológica es un epítipo HA.

5

35. Método según la reivindicación 33 o 34, que además comprende un sitio de reconocimiento de proteasas preferiblemente reconocido por la proteasa TEV o la proteasa THR.

10

36. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en donde la proteína de interés se selecciona de la lista que consiste en un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una enzima con actividad degradativa, una proteína absorbente de toxinas o contaminaciones alimentarias, una enzima con capacidad de aceptación o donación electrónica.

15

37. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en donde la segunda etiqueta de detección inmunológica es un epítipo c-Myc.

20

38. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37, en donde el marcador de selección es un marcador de auxotrofia.

39. Método según la reivindicación 38, en donde el marcador de auxotrofia es TRP, HIS o LEU.

25

40. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 39, en donde la etiqueta de purificación de la proteína de interés es una cola de Histidinas.

30

41. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40, donde el plásmido está caracterizado porque comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 13 (PW33), SEQ ID NO: 14 (PW34), SEQ ID NO: 15 (PW35), SEQ ID NO: 16 (PW36), SEQ ID NO: 17 (PW37), o SEQ ID NO: 18 (PW38).

35

42. Método según la reivindicación 33, donde la etapa (i) se lleva a cabo con una pareja

de plásmidos, en donde uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 19 (pCTcon2), SEQ ID NO: 4 (PW24), SEQ ID NO: 7 (PW27), SEQ ID NO: 10 (PW30), SEQ ID NO: 13 (PW33) y SEQ ID NO: 16 (PW36); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26),
 5 SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

43. Método según la reivindicación 33, donde la etapa (i) se lleva a cabo con una pareja de plásmidos, en donde uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en
 10 SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 14 (PW34) y SEQ ID NO: 17 (PW37); y el otro plásmido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

15
 44. Método según la reivindicación 33, donde la etapa (i) se lleva a cabo con una pareja de plásmidos, en donde uno de los plásmidos se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2 (PW22), SEQ ID NO: 5 (PW25), SEQ ID NO: 8 (PW28), SEQ ID NO: 11 (PW31), SEQ ID NO: 14 (PW34) y SEQ ID NO: 17 (PW37); y el otro plásmido se
 20 selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 3 (PW23), SEQ ID NO: 6 (PW26), SEQ ID NO: 9 (PW29), SEQ ID NO: 12 (PW32), SEQ ID NO: 15 (PW35) y SEQ ID NO: 18 (PW38).

45. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 42, en donde la proteína
 25 de interés se selecciona de la lista que consiste en un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una enzima con actividad degradativa, una proteína absorbente de toxinas o contaminaciones alimentarias, una enzima con capacidad de aceptación o donación electrónica.

30 46. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 45, en donde la transformación de la levadura en la etapa (i) se lleva a cabo mediante transformación química con LiAc y PEG.

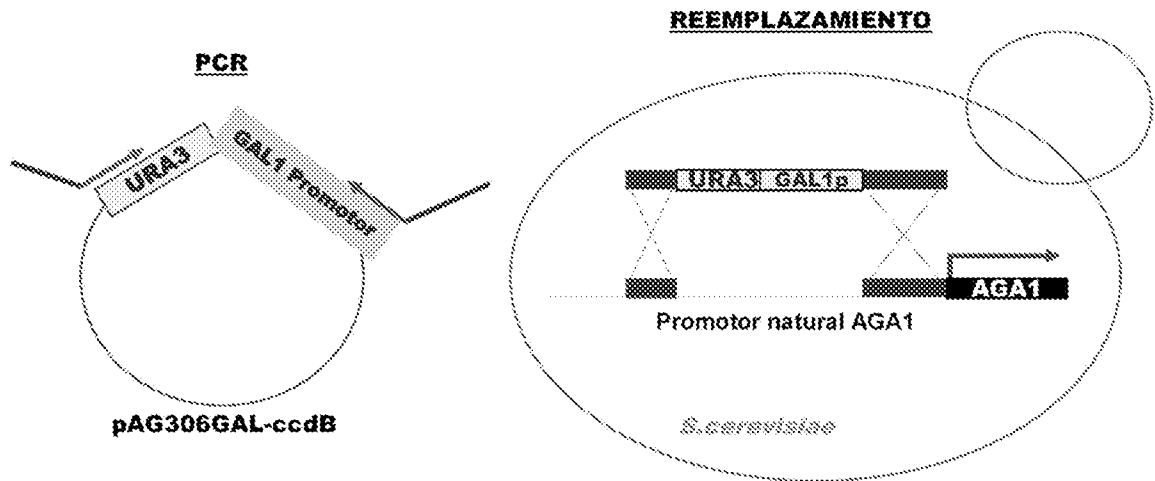


Fig. 1

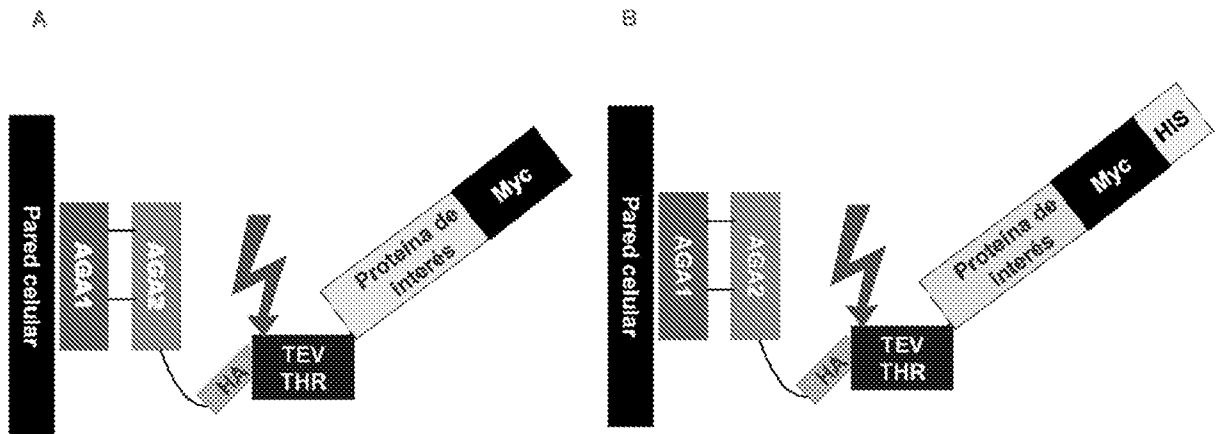


Fig. 2

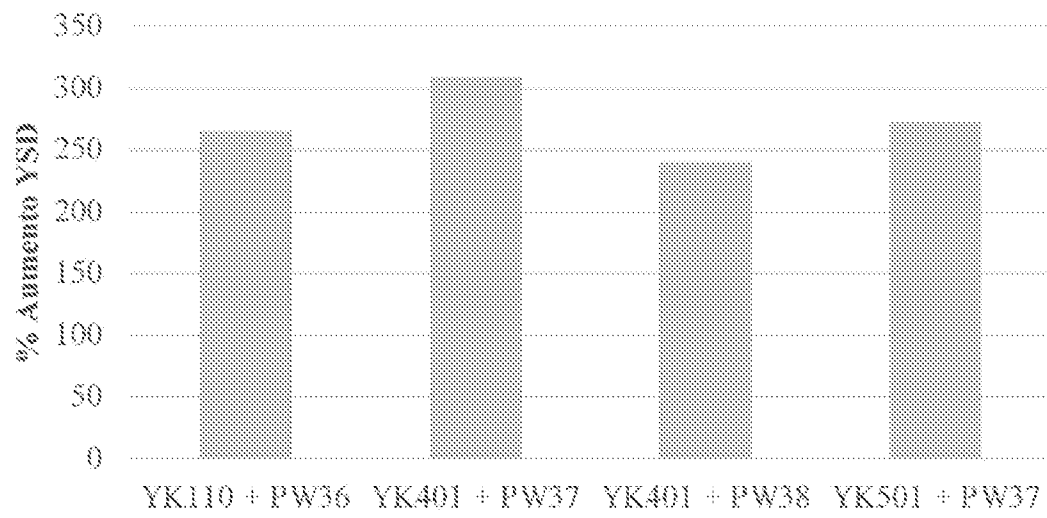


Fig. 4