

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 249**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006 E 06808581 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **30.07.2008 EP 1948794**

54 Título: **Un método para la evolución molecular in vitro de la función proteínica**

30 Prioridad:

19.11.2005 GB 0523582

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

11.02.2013

73 Titular/es:

**ALLIGATOR BIOSCIENCE AB (100.0%)
SCHEELEVAGEN 19A
223 70 LUND, SE**

72 Inventor/es:

**HARALDSSON, KARIN;
KARLSSON, MARIE;
HAGER, ANN-CHRISTIN MALMBORG;
FUREBRING, CHRISTINA;
KARLSSON, FREDRIK y
ELLMARK, PETER**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 249 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

0001 La presente invención se refiere a un método para la evolución molecular *in vitro* de la función proteínica que permite el control de la variabilidad introducida en regiones seleccionadas de una proteína matriz.

5 0002 La función proteínica puede ser modificada y mejorada *in Vitro* mediante una variedad de métodos, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio (Alber et al., Nature, 5; 330(6143):41-46, 1987) clonación combinatoria (Huse et al., Science, 246: 1275-1281, 1989; Marks et al., Biotechnology, 10: 779-783, 1992) y mutagénesis aleatoria combinada con sistemas de selección apropiados (Barbas et al., PNAS. USA, 89: 4457-4461, 1992).

10 0003 El método de mutagénesis aleatoria junto con la selección ha sido usado en una serie de casos para mejorar la función proteínica y existen dos estrategias diferentes. Primeramente, la asignación al azar de la secuencia genética completa en combinación con la selección de una proteína variante (mutante) con características deseadas, seguida por un una nueva ronda de mutagénesis aleatoria y selección. Este método puede luego repetirse hasta que se encuentre una variante de la proteína que es considerada óptima (Schier R. et al., J. Mol. Biol. 1996 263 (4): 551-567). Aquí, la vía tradicional para introducir mutaciones es por PCR propenso a error (Leung et al., Technique, 1: 11-15, 1989) con una tasa de mutación de aproximadamente 0.7%. En segundo lugar, regiones definidas del gen pueden ser mutagenizadas con cebadores degenerados, lo que permite tasas de mutación de hasta el 100% (Griffiths et al., EMBO. J, 13: 3245-3260, 1994; Yang et al., J. Mol. Biol. 254: 392-403, 1995).

20 0004 La mutación aleatoria ha sido usada extensamente en el campo de ingeniería de anticuerpos. Genes de anticuerpos formados *in vivo* pueden clonarse *in vitro* (Larrick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 160: 1250-1256, 1989) y combinaciones aleatorias de los genes que codifican los genes variables pesados y ligeros pueden estar sujetas a selección (Marks et al., Biotechnology, 10: 779-783, 1992). Fragmentos funcionales de anticuerpos seleccionados por estos métodos pueden ser además mejorados utilizando mutagénesis aleatoria y rondas adicionales de selecciones (Schier R. et al., J. Mol. Biol. 1996 263 (4): 551-567).

25 0005 Normalmente, la estrategia de la mutagénesis aleatoria es seguida por selección. Pueden seleccionarse variantes con características interesantes y las regiones de ADN mutadas de diferentes variantes, cada una con características interesantes, combinarse en una secuencia de codificación (Yang et al., J. Mol. Biol. 254: 392-403, 1995).

0006 El emparejamiento combinatorio de los genes ha sido también usado para mejorar la función proteínica, ej., afinidad de anticuerpo (Marks et al., Biotechnology, 10: 779-783, 1992).

30 0007 Otro proceso conocido para la mutación *in vitro* de la función proteínica, que se refiere a menudo como "transposición de ADN", utiliza la fragmentación aleatoria del ADN y el ensamblaje de los fragmentos en una secuencia de codificación funcional (Stemmer, Nature 370: 389-391, 1994). El proceso de transposición de ADN genera diversidad mediante la recombinación, combinando mutaciones útiles de genes individuales. Ha sido usado satisfactoriamente para evolución artificial de diferentes proteínas, ej., enzimas y citocinas (Chang et al., Nature Biotech. 17, 793-797, 1999; Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4504-4509, 1997; Christians et al., Nature Biotech. 17, 259-264, 1999). Los genes son fragmentados aleatoriamente utilizando DNasa I y luego reensamblado mediante recombinación entre sí. El material de partida puede ser un solo gen (primero mutado aleatoriamente usando PCR propenso a error) o secuencias homologas en forma natural (llamado transposición familiar).

40 0008 La DNasa I hidroliza al ADN de forma preferencial en lugares adyacentes a los nucleótidos de pirimidina, por lo tanto es una elección adecuada para la fragmentación aleatoria del ADN. Sin embargo, la actividad depende de iones Mg o Mn, los iones Mg restringen el tamaño del fragmento a 50bp, mientras que los iones Mn darán tamaños de fragmento menores que 50bp. Por tanto, con el fin de tener todos los tamaños posibles para la recombinación, el gen en cuestión necesita tratarse al menos dos veces con DNasa I en presencia de cualquiera de los dos iones diferentes, seguido por la eliminación de estos mismos iones.

45 0009 Aunque, en teoría, es posible transponer el ADN entre los clones, si el gen traspuesto resultante debe ser funcional con respecto a expresión y actividad, los clones a transponer tienen preferentemente que estar relacionados o incluso ser idénticos, con excepción de un bajo nivel de mutaciones aleatorias. La transposición de ADN entre clones genéticamente diferentes producirá generalmente genes no funcionales.

50 0010 La presente invención busca proporcionar métodos mejorados para la evolución de proteínas *in vitro*. En particular, la invención tiene como objetivo proporcionar un método que permita controlar el grado de variabilidad introducida en regiones seleccionadas de una secuencia de polinucleótidos madre.

0011 Así, según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la generación de una molécula polinucleótida variante, o la población de la misma, de una molécula de polinucleótido madre, el método comprendiendo los pasos de

55 (a) proporcionar una primera población de moléculas de polinucleótidos y una segunda población de moléculas de polinucleótidos, la primera y la segunda población juntas constituyendo cadenas positiva y negativa de una molécula de polinucleótido madre;

- (b) asimilar la primera y la segunda población de moléculas de polinucleótidos con una nucleasa para generar fragmentos de polinucleótidos;
- (c) contactar dichos fragmentos de polinucleótidos generados de las cadenas positivas con fragmentos generados de las cadenas negativas (bajo condiciones que permiten la hibridación de fragmentos); y
- 5 (d) amplificar los fragmentos que hibridan entre si para generar al menos una molécula de polinucleótido que difiere en secuencia de la molécula de polinucleótido madre

10 donde el grado de variabilidad de secuencia en una región seleccionada de al menos una molécula de polinucleótido producida en el paso (d) es controlada mediante la adición de uno o más oligonucleótidos de variabilidad predeterminada, cuyos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia que se encuentra entre, pero excluye, los nucleótidos terminales 3' y 5' de la molécula de polinucleótido madre.

15 0012 Una ventaja clave proporcionada por los métodos de la presente invención es que permiten el control del grado de la variabilidad de secuencia introducida en las secuencias de polinucleótido madre, mediante la adición de uno o más oligonucleótidos de variabilidad predeterminada. Esos oligonucleótidos son capaces de hibridarse (preferiblemente bajo condiciones de alta severidad) a una secuencia interna objetivo presente en una o más de las secuencias de polinucleótido madre.

20 0013 Los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son capaces de hibridar a una secuencia interna que se encuentra entre, pero excluye, el nucleótido terminal 3' o 5' de la molécula de polinucleótido madre (de modo que los oligonucleótidos no son capaces de hibridar a los nucleótidos terminales 3' o 5'). Por ello, el término 'oligonucleótidos de variabilidad predeterminada' no pretende abarcar las secuencias iniciadoras finales o un molde de longitud completa. Sin embargo, se apreciará que el paso (c) adicionalmente puede comprender la adición de secuencias iniciadoras que hibridan a los extremos 3' y/o 5' de al menos uno de los polinucleótidos madre bajo condiciones de hibridación.

25 0014 En una realización preferida del método de la invención, donde la primera y la segunda población de polinucleótidos son de cadena simple, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son agregados antes de o en el paso (b) y la nucleasa utilizada para digerir los polinucleótidos madre es específica para polinucleótidos de cadena simple (por ejemplo, nucleasa S1, Exo I, Exo T y nucleasa de judía Mung). Cuando se añade así, los oligonucleótidos anillan/hibridan a la primera y segunda población de polinucleótidos madre de cadena simple, produciendo de este modo regiones de doble cadena que están protegidas de la digestión de la nucleasa específica de cadena simple (ver Figura 2). Consecuentemente, la variabilidad dentro de esta secuencia protegida es controlada en los polinucleótidos variantes resultantes producidos en el paso (d).

30 0015 En una realización alternativa preferida, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada se agregan después del paso (b) y antes de o en el paso (c). En esta realización, los oligonucleótidos se agregan a los oligonucleótidos, que son luego incorporados durante el proceso de re-anillado/hibridación a los polinucleótidos variantes producidos en el paso – (d) (ver Figura 3). Otra vez, se prefiere que la primera y la segunda población de polinucleótidos sean de cadena simple en esta realización.

35 0016 El control de la variabilidad introducida en los polinucleótidos variantes producidos utilizando el método de la invención es realizado mediante el uso de oligonucleótidos de variabilidad predeterminada. Por ejemplo, pueden producirse oligonucleótidos que incorporan diversos grados de variabilidad de secuencia de nucleótidos (de no variabilidad a alta variabilidad) utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como PCR propenso a error o utilizando un sintetizador de oligonucleótidos (como los disponibles comercialmente de MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Por ello, se apreciará que el conocimiento de la secuencia de los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada no es esencial; lo que es importante es que el grado de variabilidad en los oligonucleótidos sea conocido (al menos en un sentido relativo, si no en sentido absoluto).

40 0017 Ventajosamente, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten al menos el 90% de identidad de secuencia con la secuencia interna de una secuencia de polinucleótido madre, por ejemplo al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polinucleótidos puede determinarse utilizando programas informáticos adecuados, muchos de los cuales están disponibles en línea (por ejemplo ver www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/nuc-mult.html).

45 0018 Por ejemplo, la identidad de secuencia puede ser analizada utilizando el programa Clustal W (Thompson et al., (1994) Nucleic Acids Res 22, 4673-80). Los parámetros utilizados pueden ser los siguientes:

Parámetros de alineación rápida por pareja: tamaño K-tuple (palabra); 1, tamaño de ventana; 5, penalización de gap; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento.

Parámetros de alineación múltiple: penalización de apertura de gap; 10, penalización de extensión de gap; 0.05. Matriz de puntuación: BLOSUM.

- 0019 En una realización preferida, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten el 100% de identidad de secuencia con la secuencia interna de una secuencia de polinucleótidos madre. Por ello, los oligonucleótidos pueden todos ser de una misma secuencia de nucleótidos.
- 5 0020 En una realización alternativa, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son de al menos dos secuencias diferentes. Preferentemente, los oligonucleótidos son variantes de la misma secuencia interna de una secuencia de polinucleótidos madre.
- 0021 Se apreciará que los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada pueden ser dirigidos a la misma secuencia interna o diferentes secuencias internas de los polinucleótidos madre.
- 10 0022 En una realización preferida, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten el 100% de identidad de secuencia con, o son variantes de, al menos dos regiones diferentes de los polinucleótidos madre.
- 0023 Se apreciará que los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada pueden ser de cualquier longitud siempre que no constituyan un molde de longitud completa. Preferentemente, sin embargo, los oligonucleótidos son de entre 10 y 500 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, los oligonucleótidos son entre 50 y 200 nucleótidos de longitud, por ejemplo de unos 100 nucleótidos de longitud.
- 15 0024 La invención proporciona un método para la generación de formas variantes de una secuencia de polinucleótidos madre.
- 0025 Se apreciará que el método de la invención puede ser llevado a cabo sobre cualquier polinucleótido que codifica un producto polipéptido, incluyendo cualquier proteína que tenga propiedades de unión o catalíticas, ej., anticuerpos o partes de anticuerpos, enzimas o receptores. Además, cualquier polinucleótido que tiene una función que puede ser alterada, como el ARN catalítico, puede ser mutado según la presente invención. Es preferible que el polinucleótido madre que codifica uno o más motivos de proteína es de al menos 12 nucleótidos de longitud, más preferentemente al menos 20 nucleótidos de longitud, incluso más preferible más de 50 nucleótidos de longitud. Pueden usarse polinucleótidos que son de al menos 100 nucleótidos de longitud o incluso de al menos 200 nucleótidos de longitud. Donde se usan polinucleótidos madre que codifican proteínas de gran tamaño tales como enzimas o anticuerpos, éstos pueden ser de cientos o miles de bases de longitud. La presente invención puede llevarse a cabo en cualquier tamaño de polinucleótidos madre.
- 20 25 0026 Ventajosamente, la secuencia alterada de la al menos una molécula de polinucleótidos producida en el paso (d) está asociada con una propiedad o característica alterada del polinucleótido o polipéptido codificado por la misma.
- 30 0027 La propiedad o característica alterada de un polinucleótido o polipéptido generado por el método de la invención puede ser cualquier variación o alteración en la actividad normal del polinucleótido (madre) de tipo salvaje o del polipéptido, proteína o motivos de proteína que codifica. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden aplicarse como sigue:
- (i) para modular, ya sea de forma positiva o negativa, la actividad catalítica de un enzima;
 - 35 (ii) para modular la especificidad de unión y/o afinidad de un anticuerpo;
 - (iii) para modular la especificidad de unión y/o afinidad de una interacción ligando-receptor, ej., entre una interleucina y su receptor (mediante la producción de variantes del ligando y/o receptor);
 - (iv) para modular la capacidad de un monómero polipéptido para formar formaciones multiméricas, ej., en proteínas con cubierta de virus para vacunas;
 - 40 (v) para modular la capacidad de un inmunogen para estimular la producción de anticuerpos específicos contra él; y
 - (vi) para modular la estabilidad de una proteína (ej., estabilidad en suero de hormonas y factores de crecimiento).
- 45 0028 Por ello, se apreciará que los métodos de la invención pueden ser utilizados para alterar una propiedad/función de cualquier proteína, polipéptido o polinucleótido.
- 0029 Son bien conocidos en la técnica métodos para ensayar polinucleótidos variantes o polipéptidos generados por el método de la invención respecto a propiedades alteradas. Por ejemplo, la selección de proteínas funcionales a partir de bibliotecas moleculares ha sido revolucionada por la tecnología de visualización de fagos (Parmley et al., Gene, 73: 305-391 1988; McCafferty et al., Nature, 348: 552-554, 1990; Barbas et al., PNAS. USA, 88: 7978-7982, 1991). En este método, el fenotipo (proteína) se une directamente a su genotipo correspondiente (ADN) y esto permite la clonación directa del material genético, que puede luego someterse a más modificaciones con el fin de mejorar la función proteínica. La visualización de fagos se ha utilizado para clonar ligantes funcionales a partir de una variedad de bibliotecas moleculares con hasta 10^{11} transformantes de tamaño (Griffiths et al., EMBO. J. 13:
- 50

- 3245-3260, 1994). Así, puede usarse visualización de fagos para clonar directamente ligantes funcionales de bibliotecas moleculares, y puede también usarse para mejorar además los clones originalmente seleccionados. Otros tipos de virus que han sido usados para la expresión superficial de bibliotecas de proteínas y selecciones de las mismas son baculovirus (Boublik et al *Biotechnol* 13: 1079-1084, 1995; Mottershead et al *Biochem Biophys Res Com* 238:717-722, 1997; Grabherr et al *Biotechniques* 22:730-735, 1997) y retrovirus (Buchholz et al *Nature Biotechnol* 16:951-954, 1998).
- 0030 La selección de proteínas funcionales de bibliotecas moleculares puede también realizarse mediante la visualización de la superficie celular. También aquí, el fenotipo se une directamente a su genotipo correspondiente. La visualización de la superficie de la célula bacteriana ha sido usada para, por ej., detección de variantes mejoradas de la celulasa carboximetil (CMcase) (Kim et al *Appl Environ Microbiol* 66:788-93, 2000). Otras células que pueden utilizarse para este propósito son células de levadura (Boder y Wittup *Nat. Biotechnol* 15:553-557, 1997), células COS (Higuchi et al *J. Immunol Meth* 202:193-204, 1997) y células de insecto (Granziero et al *J Immunol Meth* 203:131-139, 1997; Ernst et al *Nucleic Acids Res* 26:1718-1723, 1998).
- 0031 El polinucleótido madre preferentemente codifica una o más motivos de proteína. Estos se definen como regiones o elementos de secuencia de polinucleótidos que codifican una secuencia de polipéptido (e.d. aminoácido) que tiene una función de proteína característica. Por ejemplo, un motivo de proteína puede definir una porción de una proteína completa, tal como un epítipo, un sitio de escisión o un sitio catalítico etc.
- 0032 Varias bases de datos de investigación de motivos de proteínas y motivos de proteínas potenciales están disponibles, tales como MOTIF, PROSITE, SMART y BLOCKS (www.blocks.fhrc.org).
- 0033 Preferentemente, la región seleccionada de la molécula de polinucleótidos madre en que el grado de variabilidad es controlado corresponde a (e.d. codifica) uno o más de tales motivos de proteínas. Así, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada pueden ser dirigidos a una secuencia interna de la molécula de polinucleótidos madre que codifica un motivo de proteína.
- 0034 Se apreciará por expertos en la técnica que el método de la invención puede ser operado usando, como un polinucleótido madre, cualquier material de partida de ácido nucleico de capaz de hibridar para formar secuencias de nucleótidos complementarias de doble cadena, por ejemplo ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc). Preferentemente, la primera y la segunda población de polinucleótidos son ADNc.
- 0035 En una realización preferida, la primera y la segunda población de polinucleótidos son de cadena simple.
- 0036 Convenientemente, la primera población de polinucleótidos consiste de cadenas positivas de moléculas de polinucleótidos madre y la segunda población de polinucleótidos consiste de cadenas negativas de moléculas de polinucleótidos madre. Alternativamente, la primera y/o segunda población de polinucleótidos puede comprender ambos cadenas positivas y negativas de moléculas de polinucleótidos madre.
- 0037 Como se menciona anteriormente, el método de la invención puede usarse para producir formas variantes de cualquier secuencia de polinucleótidos madre.
- 0038 Ventajosamente, las secuencias de polinucleótidos madre se derivan mediante mutagénesis de una sola secuencia de polinucleótidos madre, e.d. las secuencias de polinucleótidos madre constituyen formas variantes de una sola secuencia de polinucleótidos. La mutación aleatoria de una secuencia de polinucleótidos madre puede realizarse mediante cualquier método convencional como se ha descrito antes, como el PCR propenso a error.
- 0039 En una realización preferida del método de la invención, las secuencias de polinucleótidos madre codifican un ligando polipéptido. Por "ligando polipéptido" incluimos cualquier polipéptido que interactúa ya sea *in vivo* o *ex vivo* con otra molécula biológica (como otro polipéptido o un polinucleótido). Preferentemente, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican una secuencia de aminoácido que interactúa, directa o indirectamente, con una molécula biológica, por ejemplo un sitio de unión o un sitio modulador.
- 0040 En una realización preferida adicional, las secuencias de polinucleótidos madre codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como las moléculas de tipo Fab (Better et al (1998) *Ciencia* 240, 1041); Moléculas Fv (Skerra et al (1998) *Science* 240, 1038); moléculas Fv de cadena simple (ScFv) (Bird et al (1998) *Science* 242, 423; Huston et al (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879) y anticuerpos de dominio simple (dAbs) (Ward et al (1989) *Nature* 341, 544). En esta realización, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada preferentemente comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican una región que determina complementariedad (CDR). Alternativamente, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada pueden compartir identidad de secuencia con, o ser variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican un polipéptido marco.
- 0041 En una realización preferida adicional, las secuencias de polinucleótidos madre codifican un enzima o un fragmento de catalíticamente activa del mismo. Aunque es usado el término "enzima", éste se debe interpretar como también incluyendo cualquier polipéptido que tiene una actividad de tipo enzima, e.d. una función catalítica. Por

- ejemplo, los polipéptidos que son parte de un enzima pueden todavía poseer función catalítica. Por otra parte, están incluidas proteínas tales como las interferonas y citocinas. En esta realización, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada preferentemente comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de secuencias de polinucleótidos madre que codifican el sitio activo, o sitio modulador (como un sitio de regulación alostérica, ej., un sitio de unión de cofactor) o una región involucrada en la estabilidad del enzima (como un sitio de escisión de proteasa).
- 0042 Aun en una realización preferida, las secuencias de polinucleótidos madre codifican un antígeno. Por "antígeno", incluimos péptidos antigénicos capaces de inducir una respuesta inmune, sea aguda o crónica, cuando se administran a un huésped mamífero. En esta realización, los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada preferentemente comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican un epítipo.
- 0043 Se apreciará por expertos en la técnica que cualquier nucleasa puede ser usado en el paso de digestión (b) para generar fragmentos polinucleótidos, por ejemplo exonucleasas, endonucleasas o enzimas de restricción, o combinaciones de las mismas. Los fragmentos individuales digeridos se purifican, mezclan y reensamblan con tecnología PCR. El gen ensamblado (reconstituido) puede luego ser clonado en un vector de expresión para expresar la proteína. La proteína puede luego ser analizada respecto a características alteradas.
- 0044 Por 'nucleasa' nos referimos a un polipéptido, ej., un enzima o fragmento del mismo, que tiene actividad nucleolítica. Preferentemente, la nucleasa es una exonucleasa. Más preferiblemente, la actividad exonucleolítica del polipéptido es mayor que la actividad endonucleolítica del polipéptido. Más preferiblemente, el polipéptido tiene actividad exonucleolítica pero está sustancialmente libre de actividad endonucleolítica.
- 0045 Exonucleasas adecuadas incluyen BAL31, exonucleasa I, exonucleasa V, exonucleasa VII, exonucleasa T7 gen 6, exonucleasa bacteriófago lambda y exonucleasa Rec J_f.
- 0046 Preferentemente, la primera y la segunda población de polinucleótidos se digieren por separado en el paso (b).
- 0047 Mediante el control de los parámetros de la reacción de la digestión de nucleasa, puede controlarse el tamaño de los fragmentos de polinucleótidos. Determinar las longitudes de los fragmentos de polinucleótidos de esta forma evita la necesidad de tener que proporcionar un paso más tal como la purificación de fragmentos de longitud deseada de un gel.
- 0048 Ventajosamente, al menos un parámetro de la reacción usada para la digestión de la primera población de moléculas de polinucleótidos es diferente del (los) parámetro(s) equivalente(s) usado(s) en la reacción para la digestión de la segunda población de moléculas de polinucleótidos. Por 'parámetro equivalente' nos referimos al mismo parámetro usado en la reacción para la digestión de la otra población de moléculas de polinucleótidos de cadena simple. Parámetros de reacción adecuados que pueden ser variados incluyen tipo de nucleasa, concentración de nucleasa, volumen de reacción, duración de la reacción de digestión, temperatura de la mezcla de reacción, pH de la mezcla de reacción, longitud de secuencias de polinucleótidos madre, la cantidad de moléculas de polinucleótidos madre y la composición del tampón de la mezcla de reacción.
- 0049 El uso de diferentes parámetros de la reacción usada para la digestión de la primera y la segunda población de moléculas de polinucleótidos proporciona la ventaja de variabilidad aumentada en los polinucleótidos variantes producidos por el método de la invención.
- 0050 En consecuencia, una realización preferida del primer aspecto de la invención proporciona un método de combinación de fragmentos de polinucleótidos para generar secuencias de polinucleótidos variantes, método que comprende los siguientes pasos:
- (a) digestión de un polinucleótido madre (preferible lineal) con una nucleasa para generar una población de fragmentos de longitudes variantes;
 - (b) ensamblaje de una secuencia de polinucleótidos desde las secuencias derivadas del paso (a)
- donde son usados oligonucleótidos de variabilidad predeterminada para controlar el grado de variabilidad en regiones seleccionadas de las secuencias de polinucleótidos resultantes.
- 0051 Preferentemente el método además comprende el paso de (c) expresar la proteína resultante codificada por la secuencia ensamblada de polinucleótidos y (d) investigar la proteína para propiedades o características alteradas.
- 0052 La presente invención también proporciona secuencias de polinucleótidos obtenidas u obtenibles por el método descrito anteriormente que tienen una secuencia de nucleótidos alterada (preferiblemente codificando un polipéptido con características alteradas/deseadas). Estas secuencias de polinucleótidos pueden usarse para generar vectores de terapia génica y constructos de terapia genética de replicación defectiva o vectores de vacunación para vacunaciones basadas en ADN. Además, las secuencias de polinucleótidos pueden usarse como herramientas de investigación.

0053 la presente invención también proporciona una biblioteca de polinucleótidos de secuencias generadas por el método descrito anteriormente de que puede ser seleccionado un polinucleótido que codifica una proteína con las características alteradas/deseadas. Es preferible que la biblioteca de polinucleótidos sea una biblioteca de ADN o ADNc.

5 0054 La presente invención también proporciona proteínas tales como enzimas, anticuerpos, y receptores con características diferentes a la del tipo salvaje producida por el método descrito anteriormente. Estas proteínas pueden usarse individualmente o en un portador farmacéuticamente aceptable como vacunas o medicamentos para terapia, por ejemplo, como inmunógenos, antígenos o de otro modo para obtener anticuerpos específicos. Pueden también usarse como herramientas de investigación.

10 0055 Con el fin de obtener expresión de la secuencia de polinucleótidos generada, el polinucleótido puede ser incorporado en un vector con secuencias de control unido de forma operable a la secuencia de polinucleótidos para controlar su expresión. Los vectores pueden incluir otras secuencias tales como promotoras o potenciadoras para conducir la expresión de la secuencia de polinucleótidos insertada, secuencias adicionales de polinucleótidos de modo que la proteína codificada por el polinucleótido es producida como unas señales de fusión y/o el ácido nucleico que codifica señales de secreción de modo que la proteína producida en la célula huésped es secretada de la célula. La proteína codificada por la secuencia de nucleótidos puede luego obtenerse mediante la transformación de los vectores en células huésped en las que el vector es funcional, cultivando las células huésped de modo que la proteína se produzca y recuperando la proteína de las células huésped o el medio circundante. Las células procariontas y eucariontas son usadas en la técnica para este propósito, incluyendo cepas de *E. coli*, levadura, y células eucariontas tales como células COS o CHO. La elección de la célula huésped puede usarse para controlar las propiedades de la proteína expresada en aquellas células, ej., controlando dónde la proteína es depositada en la células huésped o afectando a propiedades tales como la glicosilación.

20 0056 La proteína codificada por la secuencia de polinucleótidos puede ser expresada por métodos conocidos en la técnica. Convenientemente, la expresión puede lograrse mediante el crecimiento de una célula huésped en el cultivo, conteniendo tal vector, bajo condiciones apropiadas que causan o permiten la expresión de la proteína.

25 0057 Son conocidos sistemas para la clonación y expresión de una proteína en una variedad de diferentes células huésped. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células eucarióticas como las mamíferas y levaduras, y sistemas de baculovirus. También, utilizar el sistema de retrovirus para la clonación y expresión es una buena alternativa, ya que este virus puede usarse junto con una serie de tipos de células. Líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster Chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células COS y muchas otras. Un huésped común bacteriano preferido es *E. coli*.

30 0058 Vectores adecuados pueden elegirse o construirse, conteniendo secuencias regulatorias apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos, virales ej., fago, fagómido, según corresponda. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ra edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de secuencias de polinucleótidos, por ejemplo en la preparación de constructos de polinucleótidos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión genética, y análisis de proteínas, son descritos en detalle en Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds., Jhon Wiley & Sons, 1992.

35 0059 El sistema puede ser utilizado para la creación de bibliotecas de ADN que comprenden secuencias variables que pueden ser examinadas por la función de la proteína deseada en una serie de maneras. La función del enzima puede detectarse con métodos específicos para la función real del enzima ej., actividad CMCasa, actividad β -glucosidasa y también termoestabilidad. Por otra parte, la visualización de fagos y la visualización de la superficie celular pueden usarse para la detección de la función enzimática (Cramer A. et al., Nature 1998 15; 391 (6664): 288-291; Zhang J. H. et al., PNAS. USA 1997 94 (9): 4504-4509; Warren M.S. et al., Biochemistry 1996, 9; 35(27): 8855-8862; Kim et al., Appl Environ Microbiol 66:788-93,2000) así como para propiedades de unión alteradas de ej., anticuerpos (Griffith et al., EMBO J. 113:3245-3260, 1994).

40 0060 Un polipéptido proporcionado por la presente invención puede usarse en la detección de moléculas que afectan o modulan su actividad o función. Tales moléculas pueden ser útiles en un contexto terapéutico (posiblemente incluyendo la profilaxis).

0061 La presente invención también proporciona vectores que comprenden secuencias de nucleótidos generadas por el método descrito anteriormente.

55 0062 La presente invención también proporciona composiciones que comprenden ya sea secuencias de polinucleótidos, vectores que comprenden las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos generados por el método descrito anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable o un portador adecuado para propósitos de investigación.

0063 La presente invención además proporciona un método que comprende, el seguimiento de la identificación del polinucleótido o polipéptido con características deseadas por el método descrito anteriormente, la fabricación de tal polipéptido o polinucleótido en su totalidad o en parte, opcionalmente en conjunción con polipéptidos o polinucleótidos adicionales.

5 0064 Así, un aspecto más de la invención proporciona un método para hacer un polipéptido con propiedades alteradas/deseadas, el método comprendiendo los siguientes pasos:

(a) la generación de formas variantes de un polinucleótido madre usando un método según con el primer aspecto de la invención;

(b) la expresión de los polinucleótidos variante producidos el paso (a) para producir polipéptidos variante:

10 (c) la detección de los polipéptidos variantes para las propiedades deseadas; y

(d) la selección de un polipéptido con propiedades deseadas entre los polipéptidos variantes.

0065 La invención también proporciona un polipéptido obtenido por el método anterior.

15 0066 Después de la identificación de un polinucleótido o polipéptido con características alteradas/deseadas, éstos pueden luego ser fabricados para proporcionar números mayores por técnicas conocidas como PCR, clonación y expresión en una célula huésped.

20 0067 Los polipéptidos o polinucleótidos resultantes pueden usarse en la preparación de enzimas industriales, ej., enzimas de detergentes de lavado donde se prefiere una actividad mejorada a temperaturas más bajas. Alternativamente, el polinucleótido o polipéptido fabricado puede usarse como una herramienta de investigación, e.d. anticuerpos pueden usarse en inmunoensayos, y polinucleótidos pueden usarse como sondas de hibridación o cebadores. Alternativamente, los polipéptidos o polinucleótidos resultantes pueden usarse en la preparación de medicamentos para uso diagnóstico, uso farmacéutico, terapia etc. como se explica a continuación.

25 0068 Los polipéptidos o polinucleótidos generados por los métodos de la invención y identificados con características alteradas pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, en adición a una de las sustancias anteriores, un excipiente farmacéuticamente aceptable, portador, tampón, estabilizador u otros materiales bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración, ej., vías oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.

30 0069 Composiciones farmacéuticas para la administración oral puede ser en forma de pastillas, cápsulas, polvo o líquido. Una pastilla puede incluir un portador sólido tales como gelatina o un adyuvante. Composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un portador líquido como el agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución sacarina o glicoles como etileno glicol, propileno glicol o polietileno glicol.

35 0070 Para inyecciones intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la dolencia, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotonicos como inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer lactado. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos según sea necesario.

40 0071 Así, la invención además provee un polinucleótido o polipéptido producido por los métodos de la invención para uso en medicina y el uso de un polinucleótido o polipéptido producido por los métodos de la invención en la preparación de un medicamento para uso en tratamientos, terapias y/o diagnósticos de una enfermedad. Trátese de un polipéptido, ej., un anticuerpo o fragmento del mismo, un enzima, un polinucleótido o molécula de ácido nucleico, identificado tras la generación por la presente invención que debe darse a una persona, es preferible la administración en una "cantidad profilácticamente efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" (según sea el caso, aunque la profilaxis se debe considerar terapia), siendo esto suficiente para mostrar beneficio para el individuo. La cantidad real administrada, y el ritmo y duración de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, ej., decisiones sobre dosis etc, está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros médicos, y típicamente tienen en cuenta el trastorno a ser tratado, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Pharmaceutical Sciences de Remington, 16ª edición, Osol, A. 1980.

55 0072 Alternativamente, se pueden usar terapias dirigidas para suministrar el agente activo más específicamente a ciertos tipos de células, mediante el uso de sistemas dirigidos como anticuerpos o ligandos específicos de células. La orientación puede ser deseada por una variedad de razones; por ejemplo si el agente es inaceptablemente

tóxico, o si requiriera por otra razón una dosis demasiado alta, o si de otro modo no fuera capaz de entrar en las células diana.

5 0073 En vez de administrar estos agentes directamente, éstos pueden ser producidos en las células diana mediante expresión desde un gen codificador introducido en las células, ej., en un vector vírico (una variante de la técnica VDEPT e.d. el agente activador, ej., un enzima, es producido en un vector por expresión de un ADN codificado en un vector viral). El vector podría ser dirigido a las células específicas a ser tratadas, o podría contener elementos reguladores los cuales se activan más o menos selectivamente por las células diana.

10 0074 Alternativamente, el agente podría ser administrado en forma de precursor, para conversión a la forma activa por una agente activador producido en, o dirigido a, las células a ser tratadas. Este tipo de enfoque es a veces conocido como ADEPT o VDEPT; el primero implicando dirigir el agente activador a las células por conjugación a un anticuerpo de célula específica, mientras que el último consiste en producir el agente activador, ej., enzima, en un vector por expresión de ADN codificado en un vector viral (ver por ejemplo, EP-A-415731 y WO 90/07936).

0075 Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar.

15 0076 Como una alternativa más, el polinucleótido identificado con características deseables después de la generación por el método de la presente invención podría ser usado en un método de terapia genética, para el tratamiento de un paciente que es incapaz de sintetizar el polipéptido activo codificado por el polinucleótido o incapaz de sintetizarlo al nivel normal, lo que proporciona el efecto previsto por la proteína de tipo salvaje correspondiente.

20 0077 Han sido usados en la técnica anterior vectores tales como vectores virales para introducir polinucleótidos en una amplia variedad de diferentes células diana. Normalmente los vectores están expuestos a las células diana de modo que la transfección puede tener lugar en una proporción suficiente de las células para proporcionar un efecto terapéutico o profiláctico útil de la expresión del polipéptido deseado. El ácido nucleico transfectado puede ser permanentemente incorporado en el genoma de cada uno de las células diana tumorales, proporcionando un efecto de larga duración, o alternativamente el tratamiento puede tener que ser repetido periódicamente.

25 0078 Una variedad de vectores, tanto vectores virales como vectores plásmidos, son conocidos en la técnica, ver Patente US No 5,252,479 y WO 93/07282. En particular, se ha usado una serie de virus como vectores de transferencia génica, incluyendo papovavirus, tales como SV40, virus de vacuna, virus de herpes, incluyendo HSV y EBV, y retrovirus. Muchos protocolos de terapia genética en la técnica anterior han usado retrovirus de ratón desactivados.

30 0079 Como alternativa al uso de vectores virales otros métodos conocidos de introducción de ácido nucleico en células incluye electroporación, coprecipitación de fosfato de calcio, técnicas mecánicas como la microinyección, transferencia mediada por liposomas y la captación directa del ADN y la transferencia de ADN mediada por receptores.

35 0080 Como se mencionó anteriormente, el objetivo de la terapia genética usando ácido nucleico que codifica un polipéptido, o una porción activa del mismo, es aumentar la cantidad del producto de expresión del ácido nucleico en células en las cuales el nivel de polipéptido de tipo salvaje está ausente o presente sólo a niveles reducidos. Tal tratamiento puede ser terapéutico en el tratamiento de células que son ya cancerosas o profiláctico en el tratamiento de individuos de los que se conoce a través de detección que tienen un alelo de susceptibilidad y por lo tanto una predisposición a, por ejemplo, cáncer.

40 0081 La presente invención también proporciona un kit para la generación de una secuencia o población de secuencias de polinucleótido de características deseadas que comprenden reactivos para la preparación de ADNss, una exonucleasa y componentes para llevar a cabo una técnica PCR, por ejemplo, ADN termoestable (nucleótidos) y un dispositivo de frenado, por ejemplo, EGTA.

45 0082 Como se mencionó anteriormente la presente invención convenientemente proporciona la creación de secuencias de genes de enzimas mutados y su combinación aleatoria a enzimas funcionales con características deseables. Como un ejemplo de este aspecto de la invención, los genes del enzima son mutados por PCR propenso a error que resulta en una tasa de mutación de aproximadamente 0.7%. El grupo resultante de los genes de enzima mutados se digieren con una exonucleasa, ej., BAL31, y la reacción es inhibida por la adición de EGTA o por inactivación por calor en diferentes momentos, resultando en un conjunto de fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Estos pueden luego ser sometidos a un remontaje en base a PCR como se describe anteriormente. Los fragmentos de ADN re-montados resultantes son luego clonados y se construye una biblioteca de genes. Los clones pueden ser luego seleccionados de esta biblioteca y secuenciados.

55 0083 Una aplicación más de esta tecnología es la generación de una población de secuencias de ADN variables que pueden ser usadas para más selecciones y análisis. Además de codificar proteínas más grandes, ej., fragmentos de anticuerpo y enzimas, el ADN puede codificar péptidos donde las moléculas de características funcionales pueden usarse para el diseño de diferentes sistemas de selección. La selección de secuencias ADN recombinantes que

5 codifican péptidos ha sido previamente descrita (Fisch et al., PNAS. USA 1996 Jul 23; 93 (15): 7761-7766). En adición, la población de ADN variable puede usarse para producir una población de moléculas de ARN con ej., actividades catalíticas. Vaish et al., (PNAS. USA 1998 Mar 3; 95 (5): 2158-2162) demostró el diseño de sistemas funcionales para la selección del ARN catalítico y Eckstein F (Ciba Found. Symp. 1997; 209; 207-212) ha esbozado las aplicaciones del ARN catalítico mediante la introducción específica de ARN catalítico en las células. El sistema puede usarse para buscar más a través del espacio de secuencia en la selección de péptidos/moléculas funcionales con actividades catalíticas basadas en secuencias de ADN recombinantes.

0084 Se ilustrarán ahora aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Otros aspectos y realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

10 Figura 1 muestra los principios generales de la evolución molecular *in vitro* utilizando la tecnología FIND™ de Alligator Bioscience (como se describe en WO 02/48351).

Figura 2 muestra una realización preferida de los métodos de la invención donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son agregados en el paso (b).

15 Figura 3 muestra una realización preferida de los métodos de la invención donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son agregados en el paso (c).

Figura 4 muestra:

- A. Hibridización de dos diferentes ADNss de diferente longitud y polaridad.
- B. Digestión de la molécula híbrida con Exol de 3'→5'
- C. Digestión de la molécula híbrida con ExoVII de 5'→3' y 3'→5'.

20 Figura 5 muestra una imagen gel de hibridaciones de ensayo:

Ruta 1: Escala de ADN 1kb (Invitrogen)

Ruta 2: Hibridización de CT17 760bp y CT17 285bp en 10mM Tris.

Ruta 3: Hibridización de CT17 760bp y CT17 285bp en 1x tampón PCR.

Ruta 4: ADNss CT17 760bp.

25 Ruta 5: ADNss CT17 285bp.

Figura 6 muestra una imagen de gel de digestiones Exol y ExoVII:

Ruta 1: CT17 760bp sin digerir / CT17 285 híbrido en tampón Exol.

Ruta 2: CT17 760bp/ CT17 285 híbrido digerido con Exol durante 10 minutos.

Ruta 3: CT17 760bp/ CT17 285 híbrido digerido con Exol durante 20 minutos.

30 Ruta 4: CT17 760bp sin digerir / CT17 285 híbrido en tampón ExoVII.

Ruta 5: CT17 760bp/ CT17 285 híbrido digerido con ExoVII durante 20 minutos.

Ruta 6: CT17 760bp/ CT17 285 híbrido digerido con ExoVII durante 30 minutos.

Ruta 7: Estándar Masa Molecular de Precisión EZload (Bio-RAD).

EJEMPLOS

35 0085 Los métodos de la presente invención se muestran esquemáticamente en Figuras 1 a 3. Los métodos utilizan la tecnología FIND™ de Alligator Bioscience, como se describe en WO 02/48351 y WO 03/097834, en la evolución molecular *in vitro* de una o más secuencias de polinucleótidos madre.

0086 Una descripción detallada de realizaciones ejemplares de la presente invención se da a continuación.

Ejemplo 1- La tecnología FIND™

40 0087 La tecnología FIND™ se describe en WO 02/48351 y WO 03/097834.

Reactivos

0088 La polimerasa AmpliTaq® fue adquirida de Perkin-Elmer Corp., dNTPs de Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Alemania), y Nucleasa BAL31 de New England Biolabs Inc. (Beverly, USA). Todos los enzimas de restricción fueron adquiridos de New England Biolabs Inc. (Beverly, USA). El bromuro de etidio fue adquirido de Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). ADN ligasa de T4 fue adquirida de New England Biolabs Inc. (Beverly, USA). EDTA y EGTA fueron adquiridos de Kebo Lab (Suecia).

0089 Todos los cebadores fueron diseñados en el laboratorio y obtenidos de Life Technologies (Täby, Suecia) y ADN-SGS (Köping, Suecia).

PCR

0090 Todas las Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador automático (Perkin-Elmer Cetus 480, Norwalk, CT, y USA). Las técnicas PCR para la amplificación del ácido nucleico están descritas en la Patente US No 4,683,195. Referencias para el uso general de técnicas PCR incluyen Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, (1987), Ehrlich (ed), PCR technology, Stockton Press, Ny, 1989, Ehrlich et al., Science, 252:1634-1650, (1991), "PCR Protocols; A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis et al., Academic Press, New York, (1990).

Secuenciación

0091 Todos los constructos han sido secuenciados por el uso del kit de Secuenciación de Ciclo Terminador BigDye (Perkin-Elmer, Elmerill, CA, USA). La secuenciación se llevó a cabo en un Secuenciador ADN ABI Prism 377.

Electroforesis por Agarosa

0092 La electroforesis por agarosa del ADN se realizó con gel de agarosa 2% (AGAROSA (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)) con 0.25 µg/ml de bromuro de etidio en tampón de Tris-acetato (TAE-tampón 0.04M Tris-acetato, 0.001M EDTA). Muestras para electroforesis se mezclaron una solución tampón estéril de carga filtrada compuesta de 25% de Ficoll y Bromphenolic azul y cargadas en pocillos en el gel de agarosa 2%. La electroforesis se realizó a 90 V durante 45 minutos a menos que se indique lo contrario en un tampón Tris-acetato con 0.25 µg /ml de bromuro de etidio. Se purificaron con gel bandas de tamaño apropiado utilizando el Kit Qiaquick Gel Extraction (Qiegen GMBH, Hilden, Alemania) cuando se necesitó. Como estándar de peso molecular, se utilizó la escala 1 kb de marcador de peso molecular de ADN (Gibco BRL). La concentración de ADN de los productos extraídos por gel se estimó usando un espectrofotómetro.

Cepas Bacterianas

0093 La cepa *Escherichia coli* TOP10F se utilizó como un huésped bacteriano para las transformaciones. Células químicamente competentes de esta cepa se produjeron básicamente como describe Hanahan, D. 1983. Estudios de transformación de *Escherichia coli* con plásmidos. J. Mol. Biol. 166:557-580. Se produjeron células electrocompetentes de esta cepa bacteriana (Dower, W.J., J. F. Miller & C.W. Ragsdale. 1998: Transformación de alta eficiencia de *E. coli* por electroporación de alto voltaje. Nucleic Acids Res. 16:6127).

Plásmidos

0094 Todas las manipulaciones genéticas se realizaron en pFab5chis como se describe en Sambrook, Molecular Cloning; un manual de laboratorio (segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El vector pFab5chis es diseñado para albergar cualquier gen scFv insertado entre sitios SfiI y NotI (ver Emgberg et al., 1995, métodos Mol. Biol. 51:355-376). El sitio SfiI está ubicado en el pelB leadery el sitio NotI esta ubicado justo después de la región VL, de modo que se inserta VH-linker-VL. En este caso, se utilizó un anticuerpo dirigido a CD40.

Cebadores

0095 Se diseñaron dos cebadores biotinilados circundando al gen del anticuerpo de pFab5chis con las siguientes secuencias incluyendo sitios únicos de restricción designados:

1736 SfiI Cebador hacia delante:

5'-ATT ACT CGC GGC CCA GC ▼ C GGC CAT GGC CCA CAG GTC AAG

CTC GA

y 1735 NotI cebador inverso:

5'-TTA GAG CCT GC.G GCC GCC TTG TCA TCG TCG TCC TT

(donde '▼' designa el sitio de escisión)

0096 Se diseñaron dos cebadores no biotinilados circundando al gen del anticuerpo de pFab5chis con las siguientes secuencias incluyendo sitios designados de restricción:

1664 Sfil cebador hacia delante:

5'-ATT ACT CGC GGC CCA GC▼C GGC CAT GGC CCA CAG GTC AAG
CTC GA

5

y 1635 NotI cebador inverso:

5'- TTA GAG CCT GC.G GCC GCC TTG TCA TCG TCG TCC TT

PCR Estándar

10 0097 Reacciones PCR estándar se llevaron a cabo en 25 ciclos consistiendo del siguiente perfil: desnaturalización (94° C, 1 minuto), hibridación de cebador (55°C, 1minuto) y extensión (72°C, 3 minutos). Cada reacción PCR contuvo 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 1 μM cebador delantero, 1 μM cebador inverso, 1.25 U AmpliTaq® polimerasa de ADN termoestable (Perkin-Elmer Corp.), y 50 ng plantilla en un volumen final de 100 μl.

PCR Propenso a error

15 0098 Las reacciones PCR propenso a error se llevaron a cabo en un tampón 10 x que contiene 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5mM MgCl₂ 100 μg de gelatina (según Kuipers et al., Nucleic Acids Res. 1991, Aug 25;19 (16):4548 pero con concentración de MgCl₂ aumentada de 2 mM a 5 mM).

0099 Por cada reacción de 100 μl se mezcló lo siguiente:

	dATP 5 mM	5 μl
20	dGTP 5 mM	5 μl
	dTTP 10 mM	10 μl
	dCTP 10 mM	10 μl
	20 mM cebador 3'	1.5 μl
	20 mM cebador 5'	1.5 μl
25	Tampón Kuipers 10x	10 μl
	H ₂ O estéril mp	46.3 μl

30 0100 Se agregó la plantilla en el vector pFab5chis en una cantidad de 50 ng. 10 μl de 10 mM MnCl₂ y se comprobó que en el tubo no ocurrió precipitación de MnO₂. Finalmente se agregaron 5 Unidades de enzima Taq. El PCR propenso a error se llevó a cabo a las siguientes temperaturas durante 25 ciclos sin un arranque en caliente: 94°C 1', 45°C 1', 72°C 1', + 72°C durante 7 minutos. El producto resultante fue un inserto propenso a error (e.d. mutado) de 750 bp. Este inserto se purificó con el kit de purificación PCR Gibco, antes de tratamiento adicional.

Generación de ADN de cadena simple por cebadores biotinilados

35 0101 El fragmento de interés se amplificó mediante dos reacciones PCR separadas. Estas reacciones pueden ser PCR estándar como se describió anteriormente o PCR propenso a error también descrito anteriormente. Los cebadores deben ser diseñados de modo que en una reacción el cebador delantero es biotinilado y en la otra reacción el cebador inverso es biotinilado. Por ejemplo, reacciones PCR con A) cebadores 1736 y 1635 y B) cebadores 1664 y 1735, con el perfil mencionado anteriormente se realizaron durante 25 ciclos con el anticuerpo pFab5chis como plantilla. Esto produjo productos PCR de aproximadamente 750 bp: en A la cadena superior era biotinilada; y en B la cadena inferior era biotinilada.

40 0102 Las cadenas no biotiniladas fueron recuperadas por purificación usando una matriz sólida recubierta con estreptavidina ej., Dynabeads. Las perlas magnéticas se lavan y equilibran con PBS/BSA 1% y tampón B&W conteniendo 5 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, y 0.5 mM EGTA. 100 μl de cada producto PCR se mezclan con 100 μl de perlas disueltas en tampón B&W 2 x y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos con rotación. Se eliminan productos PCR sin consolidar por lavado cuidadoso dos veces con B&W. La cadena no biotinilada del ADN

capturado se eluye mediante desnaturalización alcalina dejando el ADN incubando con 25 µl de NaOH 0.1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. La solución es separada de las perlas y neutralizada con 7.5 µl de HCl 0.33 M y 2.5 µl de Tris pH 8.1 M.

Generación de ADN de cadena simple usando fago

- 5 0103 El fragmento de interés se clonó en vectores M13 bacteriófagos M13mp18 y M13mp19 usando enzimas de restricción PstI/HindIII. El bacteriófago se propagó usando la cepa *Escherichia coli* TOP10F' según métodos convencionales. El ADN de cadena simple para la cadena superior se preparó del vector bacteriófago M13mp18 y el ADN de cadena simple para la cadena inferior se preparó del vector bacteriófago M13mp19. Brevemente, 1.5 ml de un cultivo de bacterias infectadas se centrifugó a 12000g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se precipitó con 10 200 µl de 20% PEG8000/ NaCl 2.5 M. El bacteriófago en gránulos se resuspendió en 100 µl de TE. Se agregó 50 µl de fenol equilibrado con Tris-Cl (pH 8.0) y se centrifugó la muestra. Después de la centrifugación a 12000g durante 1 minuto a temperatura ambiente la fase superior, conteniendo el ADN, se transfirió y precipitó con etanol. El granulado de ADN se disolvió en 50 µl de TE (pH 8.0) y almacenó a -20°C. (Sambrook et al. Molecular Cloning, Un manual de laboratorio 2da edición. Cold Spring Harbor Laboratorio Press. 1989, capítulo 4). El ADN de cadena simple preparado a partir de fago es circular y debe abrirse antes del tratamiento BAL31. Esto puede realizarse con una endonucleasa capaz de escindir el ADN de cadena simple.

Generación de ADN de cadena simple usando PCR asimétrico

- 0104 Se purifican productos PCR usando una columna de centrifugación para eliminar el exceso de cebadores de los PCR previos. Se utilizan 150 ng del producto purificado como plantilla en un amplificador lineal llevado a cabo en 20 100 µl de tampón PCR 1xGeneAmp® 10x que contiene 1.5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 µM de cada dNTP (New England BioLabs), 1.25 U AmpliTaq® polimerasa ADN (Applied Biosystems) y 1.0 µM de un solo cebador. Las condiciones del ciclo PCR son: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto seguido por extensión a 72°C durante 7 minutos.
- 0105 Los productos PCR asimétricos son separados por tamaño de la plantilla de doble cadena en un gel de agarosa 1% y purificados usando el Kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen).

Generación de ADN de cadena simple usando exonucleasa Lambda

- 0106 Inicialmente se produce un fragmento de ADNds usando reacciones PCR estándar creando un ADN con sitios únicos de enzimas de restricción (RE) en el extremo 5' y 3' respectivamente. La reacción PCR se divide en dos y la RE es digerida respectivamente para crear una fosforilación 5' preferencialmente con enzimas de restricción creando 30 extremos 3' voladizos o romos. La digestión se realiza en un tampón adecuado y durante la noche para llevar a cabo la digestión completa. Si tiene que usarse un enzima que crea un voladizo 5' el voladizo puede llenarse usando una polimerasa ADN. Después de la purificación se tratan 1-4 µg ADNds con 10 U de exonucleasa Lambda (ej., Strandase™ de Novagen o exonucleasa Lambda de NEB) en un tampón acompañado específico durante 30 minutos a 37°C y la reacción se para a 75°C durante 10 minutos. El ADNds se separa además de cualquier residuo del ADNds en un gel de agarosa usando métodos estándar de extracción de gel.

Generación de ADN fragmentado de cadena simple usando BAL 31

- 0107 Las cadenas ADNss (conteniendo cadenas superiores e inferiores, respectivamente) fueron sometidas a distintos tratamientos enzimáticos usando ej., BAL 31 (e.d. las cadenas superiores fueron digeridas separadamente de las cadenas inferiores). Cada reacción de digestión contenía 0.02 µg/µl ADNss, 600 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 40 12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 1 mM EDTA pH 8.0 y BAL 31 en varias concentraciones enzimáticas que van de 0.1 – 5 U/ml. Las reacciones se incubaron a 30°C y fracciones de ADNss digeridas se recogieron secuencialmente a 10, 30, 60 y 120 segundos o más. Las reacciones fueron detenidas por adición de EDTA y tratamiento térmico a 65°C durante 10 minutos. Los fragmentos de ADNss se purificaron por extracción por fenol/cloroformo y el etanol precipitó. Los ADNss se resuspenden en 10 mM Tris pH 8.0.
- 0108 El patrón de digestión se evaluó por electroforesis de gel de agarosa 1%.

Purificación de fragmentos producidos por digestión

- 0109 Los fragmentos de ADN digeridos se purificaron mediante extracción de fenol/cloroformo/isoamilalcohol. Se agregaron 50 µl de fenol tamponado a cada tubo de muestra de 100 µl junto con 50 µl de una mezcla de cloroformo y isoamilalcohol (24:1). Los tubos se centrifugaron durante 30 segundos y luego se centrifugaron durante 1 minuto en una microcentrifuga a 14000 r.p.m. La fase superior fue luego recogida y mezclada con 2.5 volúmenes de etanol al 99.5% (1/10 era Acetato de Sodio 3M, pH 5.2). El ADN fue precipitado durante 1 hora a -80°C. El ADN se granuló por centrifugación durante 30 minutos en una microcentrifuga a 14000 r.p.m. El granulado se lavó una vez con etanol al 70% y luego se volvió a disolver en 10 µl de agua estéril.

Análisis de fragmentos purificados producidos por digestión en gel de agarosa

0110 5 µl del granulado disuelto de cada momento y del blanco se mezclaron con 2.5 µl de tampón de carga (25% Ficoll y Bromphenolic azul) y cargado en pocillos en un 2% de gel de agarosa. La electroforesis de los diferentes momentos se realizó como anteriormente.

5 *Re-montaje de fragmentos de longitud completa*

0111 Se consigue el re-montaje de los fragmentos del ADNss por dos reacciones PCR secuenciales. La primera reacción PCR secuencial debe contener 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.3 U polimerasa Taq y 2 µl de muestra tratada BAL31, todo en un volumen final de 25 µl, y sometido a 5 ciclos con el siguiente perfil: 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos + 72°C durante 5 minutos.

10 La segunda reacción PCR debe contener 10 mM tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.6 U polimerasa Taq, 1 µM cebador delantero, 1 µM cebador inverso, y 5 µl de muestra de la primera reacción de PCR, todo en un volumen final de 50 µl, y sometido a 15 ciclos con el siguiente perfil: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos + 72°C durante 7 minutos.

0112 Los productos resultantes pueden ser evaluados por electroforesis en gel de agarosa.

15 *Digestión de restricción del fragmento re-montado y el plásmido con Sfil y NotI*

0113 El fragmento re-montado y el plásmido pFab5chis se escindieron primero con Sfil usando tampón NEB 2 incluyendo BSA y 11 U enzima/µg ADN. La reacción se llevó a cabo durante 4 h a 50°C. Después de esto el ADN se escindió con NotI añadiendo tampón de conversión y 6 U enzima/µg ADN. Esta reacción se llevó a cabo a 37°C durante la noche.

20 *Purificación en gel del vector digerido de restricción y el fragmento re-montado digerido de restricción*

0114 Las reacciones de escisión se analizaron en un gel de agarosa 1%. El inserto digerido de restricción mostró un producto de escisión de unos 750 bp. Este corresponde bien con el tamaño deseado. La banda del inserto escindido y el plásmido se cortó y se extrajo por gel como se describió anteriormente.

Ligación del fragmento re-montado digerido de restricción con pFab5chis digerida de restricción

25 0115 pFab5chis purificado escindido se ligó con el fragmento re-montado digerido de restricción en baño de agua a 12°C durante 16 horas. 50 µl del vector se mezclaron con 50 µl del inserto y 15 µl de tampón 10x (suministrado con el enzima), 7.5 µl de ligasa (5 U/µl) y agua estéril a un volumen final de 150 µl. Una ligación de pFab5chis digerido de restricción sin ningún inserto también se realizó de la misma manera.

Transformación de E. coli TOP10F' químicamente competente con el inserto ligado re-montado y pFab5chis

30 0116 Las reacciones de ligación se purificaron por extracción de fenol/cloroformo como se describió anteriormente. La fase superior de la extracción se recogió y mezcló con 2.5 de volúmenes de etanol al 99.5% (1/10 fue Acetato de Sodio 3M, pH 5.2). El ADN fue precipitado durante 1 hora a -80°C. El ADN fue luego granulado por centrifugación durante 30 minutos en una microcentrífuga a 14000 r.p.m. El granulado fue lavado una vez con etanol al 70% y luego se volvió a disolver en 10 µl de agua estéril. 5 µl de cada ligación se mezclaron separadamente con 95 µl de

35 *E. coli* TOP10F' químicamente competente incubado en hielo durante 1 hora y luego transformado (Sambrook et al., Molecular Cloning, Un manual de laboratorio 2da edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989). Después de crecimiento durante una hora las bacterias de las dos transformaciones se extendieron en placas de agar conteniendo ampicilina (100 µg/ml). Las placas fueron cultivadas boca abajo en un incubador a 37°C durante 14 horas.

40 **Ejemplo 2 – Control de variabilidad usando oligonucleótidos de variedad predeterminada I**

Introducción

0117 La justificación de este conjunto de experimentos fue que en muchos casos habría un interés bien en mutar específicamente un área de interés como en regiones CDR de un anticuerpo y mantener el marco sin cambios o bien en agregar regiones no mutadas tales como un sitio activo de un enzima que inhibe los sucesos de

45 recombinación en esta área.

0118 Los genes de ensayo usados aquí fueron A2.30 y A2.54 (Ellmark et al. 2002 Molecular Immunology 39:349-356), dos clones scFv con especificidad para CD40.

Materiales y Métodos

Producción de oligonucleótidos de variabilidad predeterminada

0119 Oligonucleótidos de variabilidad predeterminada, que corresponden a formas mutadas de CDR2 de A2.30, se produjeron como sigue.

- 5 0120 Se realizaron dos rondas secuenciales de PCR con condiciones Propenso a Error (ver Tabla 1a y 1b) en el clon A2.30 usando cebadores #137 y #138 (ver Tabla 1c) creando productos PCR mutados cubriendo bp 56 a bp 352 del A2.30. Un tercer PCR con condiciones Propenso a Error se realizó con cebadores #351 y #357* o #354* y #350 (* indicando un etiquetado 5'-biotina) creando fragmentos CDR2 que cubren la secuencia interna desde bp 104 a bp 221 del clon A2.30. Estos productos PCR fueron mutados aún más usando el Kit de Mutagenesis PCR Gene Morph™ (Stratagene) usando los mismos cebadores. De los productos PCR biotinilados el ADNss se purificó usando el kit Strepatavidin μMACS (Miltenyi Biotec) y se hizo una purificación adicional en geles de agarosa donde el ADNss se recuperó usando Recochips (TaKaRa). El ADNss se precipitó con NaAc/etanol y luego se redisolvió en 10mM Tris-HCl pH 8.0.

Tabla 1(a)

<i>Reactivo (productor)</i>	<i>Concentración final</i>
Geneamp 10xPCR tampón oro (Applied Biosystems)	1x
25 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	7mM
0.1% (p/v) gelatina (Sigma)	0.01%
5mM dATP (New England Biolabs)	0.2 mM
5mM dGTP (New England Biolabs)	0.2 mM
10mM dTTP (New England Biolabs)	1 mM
10mM dCTP (New England Biolabs)	1 mM
20uM cebador oligonucleótido	300 nM
20uM cebador oligonucleótido	300 nM
5mM MnCl ₂ (Merck)	0.5 mM
5U/uL AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0.025 U/uL
ADN	4 ng o 4 uL de producto PCR

15 **Tabla 1(b)**

<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	94°C	7 min
30	94°C	30 seg
	45°C	30 seg
	72°C	30 seg
1	72°C	7 min

Tabla 1(c)

Cebador# Secuencia

137

CGC GAA TTG GCC CAG CCG GCC ATG GCC
GAG GTG CAG CTG TTG GAG

AGA TGG GGG ACT AGT GCT GCT CAC GGT
GAC

5 138

350 CCTGGAGCCTGGCGGACCCA

351 GCTGGGTCCGCCAGGCTCCA

354* BIO-GACTCTCCTGTGCAGCCTCT

357* BIO-TTGTCTCTGGAGATGGTGAA

10 226

CTCACTATAGGGCGAATTGG

415 TTCAGATCTCGAGGTGCAGCTGTTGGAG

224 CCTATTGCCTACGGCAGCC

332* BIO-CCTATTGCCTACGGCAGCC

333* BIO-CTCACTATAGGGCGAATTGG

15

Producción de polinucleótidos madre de cadena simple (Paso 'a')

0121 Una reacción PCR estándar (tabla 2a y 2b) se hizo sobre los clones A2.30 y A2.54 con cebadores #224 y #333* o #332* y #226 (* indicando un etiquetado con 5' biotina). El ADNss, que sirvió como polinucleótidos madre, se purificó como se describió previamente.

Digestión de polinucleótidos madre de cadena simple (paso 'b')

20

0122 Tratamientos de exonucleasa se realizaron en cadenas separadas de sentido y de antisentido como se muestra en la tabla 3 en sistemas tampón indicados por el productor.

Tabla 2a

<i>Reactivo (productor)</i>	<i>Concentración final</i>
Geneamp 10xPCR tampón oro (Applied Biosystems)	1x
25 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	3mM
10mM dNTP (New England Biolabs)	0.2 mM
20uM cebador oligonucleótido	500 nM
20uM cebador oligonucleótido	500 nM
5U/uL AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0.025U/uL
ADN	4 ng

Tabla 2(b)

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	7 min
30	94°C	30 seg
	58°C	30 seg
	72°C	60 seg
1	72°C	7 min

Tabla 3

Exonucleasa (productor)	Cantidad de enzima/μgADNss	Tiempo
ExoI (New England Biolabs)	100 U/μg	10 min
ExoV (USB)	25 U/μg	30 min
ExoVII (USB)	5 U/μg	30 min

5 *Generación de polinucleótidos variantes (Pasos 'c' y 'd')*

0123 El re-montado se logró en dos etapas. En la primera reacción de re-montaje (PCR1, tabla 4a y 4b) 7.5ng ADNss fragmentadas por exonucleasa de sentido y antisentido de A2-30 y A2-54, respectivamente, se mezclaron con 5ng de fragmentos CDR2 de sentido (estos últimos constituyendo oligonucleótidos de variabilidad predeterminada; ver antes). Después de 25 ciclos de PCR1 la mezcla total de reacción se agregó a una segunda reacción PCR para amplificación, donde los cebadores fueron añadidos para permitir la formación de polinucleótidos de cadena larga (PCR2 tabla 4a y 4b).

10

0124 Los productos PCR resultantes fueron ligados en un Sistema de Vector pGEM-T (Promega) y secuenciados.

Tabla 4(a)

Reactivo (productor)	Concentración final PCR1	Concentración final PCR2
Geneamp 10xPCR tampón oro (Applied Biosystems)	1x	1x
25 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	1.5mM	1.5mM
1.25mM dNTP (New England Biolabs)	0.2 mM	0.2mM
20uM cebador oligonucleótido #415	-	1mM
20uM cebador oligonucleótido #226	-	1mM
5U/uL AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0.01215U/uL	0.025U/uL
ADN	35ng (ver texto)	Todo de PCR1

Tabla 4(b)

PCR1			PCR2		
Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	7 min	1	95°C	7 min
25	94°C	30 seg	30	94°C	30 seg
	50°C	45 seg		58°C	45 seg
	72°C	60 seg		72°C	120 seg
1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

Resultados y conclusiones

5 0125 Veinte clones producidos como se describe anteriormente, usando el método de la invención, fueron secuenciados y analizados para mutaciones en comparación con A.2-30 y A.2-54.

0126 La frecuencia de mutación general fue 1 mutación/1000bp, lo que corresponde a una frecuencia normal de mutación con amplificación PCR estándar (e.d. no PCR propenso a error).

10 0127 Sin embargo, siete de los veinte clones (35%) tenían uno o dos mutaciones en la región interna CDR278 bp. Esto es claramente superior a la probabilidad de mutaciones inducidas por PCR solamente y por lo tanto sólo puede ser explicada como inducida por la adición en el paso (c) de los oligonucleótidos CDR2 pre-mutados (e.d. los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada). Todos los clones con mutaciones en la región CDR2 mostraron recombinaciones entre los dos clones iniciales A2.30 y A2.54. El número de recombinaciones en estos clones osciló de uno a cuatro. La frecuencia general de recombinación de la biblioteca fue 1.4 recombinaciones por secuencia.

15 0128 En conclusión, este experimento demuestra que los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada pueden usarse para aumentar selectivamente la variabilidad dentro de una región seleccionada (CDR2) de un polinucleótido madre que codifica una molécula scFv.

Ejemplo 3 – Control de variabilidad usando oligonucleótidos de variabilidad predeterminada II

Introducción

0129 El siguiente experimento fue también realizado usando clones scFv A2.30 y A2.54.

20 **Materiales y métodos**

Producción de oligonucleótidos de variabilidad predeterminada

0130 Oligonucleótidos de variabilidad predeterminada, correspondientes a fragmentos de ADNss CDR1, CDR2, CDR3 y CDR1+2 mutados, fueron producidos de la siguiente manera.

25 0131 Dos rondas secuenciales de PCR-con condiciones Propenso a Error (tabla 5a y 5b) se realizaron sobre el clon A2.30 usando cebadores #137 y #138 (ver tabla 5c) creando productos PCR mutados que cubren bp 56 a bp 352 del A2.30. Un tercer PCR con condiciones Propenso a Error se realizó usando cebadores que crean los fragmentos mostrados en la tabla 6. Estos productos PCR fueron mutados adicionalmente usando el Kit de Mutagénesis PCR Gene Morph™ (Stratagene) usando los mismos cebadores que antes e indicados en la tabla 6.

30 0132 Después de la ligación en un Sistema de Vector pGEM-T (Promega) y secuenciado, la frecuencia de mutación comparada a A2-30 fue calculada como se muestra en la tabla 7.

Tabla 5(a)

<i>Reactivo (productor)</i>	<i>Concentración final</i>
Geneamp 10xPCR tampón oro (Applied Biosystems)	1x
25 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	7mM
Gelatina 0.1% (p/v) (Sigma)	0.01%
5mM dATP (New England Biolabs)	0.2 mM
5mM dGTP (New England Biolabs)	0.2 mM
10mM dTTP (New England Biolabs)	1 mM
10mM dCTP (New England Biolabs)	1 mM
20uM cebador oligonucleótido	300 nM
20uM cebador oligonucleótido	300 nM
5mM MnCl ₂ (Merck)	0.5 mM
5U/uL AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0.025 U/uL
ADN	4 ng o 4 µL de producto PCR

Tabla 5(b)

<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	94°C	7 min
30	94°C	30 seg
	45°C	30 seg
	72°C	30 seg
1	72°C	7 min

5

Tabla 5(c)

Cebador# Secuencia

137

CGC GAA TTG GCC CAG CCG GCC ATG GCC

GAG GTG CAG CTG TTG GAG

AGA TGG GGG ACT AGT GCT GCT CAC GGT

GAC

138

10 349 GACTCTCCTGTGCAGCCTCT

350 CCTGGAGCCTGGCGGACCCA
 351 GCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 352 TTGTCTCTGGAGATGGTGAA
 354* BIO-GACTCTCCTGTGCAGCCTCT
 5 355* BIO-CCTGGAGCCTGGCGGACCCA
 356* BIO-GCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 357* BIO-TTGTCTCTGGAGATGGTGAA
 226 CTCACTATAGGGCGAATTGG
 415 TTCAGATCTCGAGGTGCAGCTGTTGGAG
 10 224 CCTATTGCCTACGGCAGCC
 332* BIO-CCTATTGCCTACGGCAGCC
 333* BIO-CTCACTATAGGGCGAATTGG
 384 CACTGCCGTGTATTACTGT
 386* BIO-CAGTGTACCTTGGCCCCA

15 **Tabla 6**

Fragmento mutado	Posición en el gen modelo incluyendo cebadores (bp)	Cebador # usado para purificar cadenas con sentido		Cebador # usado para purificar cadenas con antisentido	
CDR1	56-125	349	355*	354*	350
CDR2	104-221	351	357*	356*	352
CDR3	270-352	384	386*		

* indica el etiquetado 5'-biotina del oligonucleótido

Tabla 7

Fragmento	Frecuencia de Mutación
CDR1	2.7/10 bp
CDR2	0.7/100 bp
CDR3	

20 0133 A partir de los productos PCR biotinilados indicados en la tabla 6, ADNss fue purificado usando el kit μ MACS Streptavidin (Miltenyi Biotec). La purificación adicional se llevó a cabo en geles de agarosa, de los que fue recuperado ADNss usando Recochips (TaKaRa).

0134 El ADNss, que sirvió de oligonucleótidos de variabilidad predeterminada en el siguiente experimento, fue precipitado con NaAc/etanol y luego se volvió a disolver en 10mM Tris-HCl pH 8.0.

Producción de polinucleótidos madre (Paso 'a')

25 0135 Una reacción PCR estándar (tabla 8) se hizo sobre A2.30 y A2.54 con cebadores indicados (tabla 9). ADNss, que sirvió como polinucleótidos madre, fue purificado como se describe anteriormente.

Digestión de polinucleótidos madre de cadena simple (Paso 'b')

0136 Se realizaron tratamientos de exonucleasa sobre cadenas separadas con sentido y antisentido como se muestra en la tabla 10.

Tabla 8

<i>Reactivo (productor)</i>	<i>Concentración final</i>
Geneamp 10xPCR tampón oro (Applied Biosystems)	1x
25 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	3mM
10mM dATP (New England Biolabs)	0.2 mM
20uM cebador oligonucleótido	500 nM
20uM cebador oligonucleótido	500 nM
5U/uL AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0.025U/uL
ADN	4ng

5 **Tabla 9**

<i>ADN</i>	<i>Cebadores usados para purificar cadenas con sentido</i>		<i>Cebadores usados para purificar cadenas con antisentido</i>	
A2.30	224	333*	332*	226
A2.54	224	333*	332*	226
* indica etiquetado del oligonucleótido con 5'-biotina				

Tabla 10

<i>Exonucleasa</i>	<i>Cantidad de enzima/μgADNss</i>	<i>Tiempo</i>
ExoI	100 U/μg	10 min
ExoV	25 U/μg	30 min
ExoVII	5 U/μg	30 min

Generación de polinucleótidos variantes (Pasos 'c' y 'd')

- 10 0137 Se hizo un conjunto de bibliotecas. Se hicieron PCRs de re-montaje en dos etapas. En la primera, PCR1, ADNss con sentido y antisentido fragmentada con exonucleasa de A2-30 y A2-54, respectivamente, se mezclaron con oligonucleótidos correspondientes a las formas mutadas de CDR1, CDR2 y/o CDR3 ('oligonucleótidos de variabilidad predeterminada'), como se indica en la tabla 11a y 13b.
- 15 0138 Después de 25 ciclos de PCR1 (tabla 12a y 12b) toda la mezcla de reacción se añadió a una segunda reacción (PCR2; tabla 12a y 12b), que también contenía los cebadores específicos de extremo, y se llevaron a cabo 20 ciclos. Los productos PCR se ligaron en un Sistema de Vector pGEM-T (Promega) y se secuenciaron.

Tabla 11(a)

Biblioteca	ng A2.30 sentido/ /antisentido tratado con exonucleasa	ng A2.54 sentido/ /antisentido mutado tratado con exonucleasa	Fragmento CDR1 sentido/antisentido	ng Fragmento CDR2 mutado sentido/antisentido
A	7.5/7.5	7.5/7.5	0.75/0.75	-
B	7.5/7.5	7.5/7.5	-	1.25/1.25
C	7.5/7.5	7.5/7.5	-	1.25/-
D	7.5/7.5	7.5/7.5	-	2.5/-
E	7.5/7.5	7.5/7.5	-	5/-

Tabla 11(b)

Biblioteca	ng A2.30 sentido/ /antisentido tratado con exonucleasa	ng A2.54 sentido/ /antisentido mutado tratado con exonucleasa	ng Fragmentos CDR1/CDR2/CDR3 con sentido mutados
F	30/30	30/30	3/5/3.6
G	30/30	30/30	3/5/3.6

5 **Tabla 12(a)**

Reactivo (productora)	Concentración final PCR1	Concentración final PCR2
Geneamp 10xPCR tampón oro (Applied Biosystems)	1x	1x
25 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	1.5mM	1.5mM
1.25mM dNTP (New England Biolabs)	0.2 mM	0.2mM
20uM cebador oligonucleótido #415	-	1mM
20uM cebador oligonucleótido #226	-	1mM
5U/uL AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0.01215U/uL	0.025U/uL
ADN	Ver tabla 13a y 13b	Todo de PCR1

Tabla 12(b)

PCR1			PCR2		
Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	7 min	1	95°C	7 min
25	94°C	30 seg	30	94°C	30 seg
	50°C	45 seg		58°C	45 seg
	72°C	60 seg		72°C	120 seg
1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

Resultados y conclusiones

10 0139 La frecuencia general de mutación fue 1 mutación/1000bp, que corresponde a una frecuencia normal de mutación con amplificación PCR estándar (e.d. no PCR propenso a error).

0140 Entre 11% y 56% de los clones en las diferentes bibliotecas mostraron mutaciones en sus regiones CDR que corresponden a los oligonucleótidos agregados de variabilidad predeterminada (tabla 13). Los tramos mutados fueron 30 bp, 78 bp y 46 bp para CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. La incidencia de mutación en estas áreas después de la adición de los fragmentos CDR fue claramente superior a la probabilidad de mutaciones inducidas por PCR solo y por lo tanto sólo pueden explicarse por la adición de los oligonucleótidos pre-mutados.

5

Tabla 13

Biblioteca (clones analizados)	Secuencias mutadas en CDR1/ CDR2/CDR3	Clones con regiones de mutación CDR mutaciones/1000bp	Frecuencia de mutación en gen (región(es) –CDR)	Recombinaciones/ secuencia en general
A (19)	2/na/na	11 %	0.71	1.9
B (18)	na/6/na	33%	0.86	2.4
C (16)	na/3/na	19%	0.90	2.6
D (18)	na/2/na	11 %	0.84	2.2
E (20)	na/7/na	35%	1.13	1.3
F (16)	4/2/4^	56%	0.79	2.6
G (20)	2/3/3"	35%	0.85	2.1

Na = no aplicable
 ^ un clon con mutaciones en ambas CDR2 y CDR3
 " un clon con mutaciones en ambas CDR1 y CDR3

0141 En conclusión, este experimento demuestra que los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada pueden usarse para incrementar selectivamente la variabilidad dentro de regiones múltiples seleccionadas (CDR1, CDR2 y CDR3) de un polinucleótido madre que codifica una molécula scFv.

10

Ejemplo 4 – Control de variabilidad usando oligonucleótidos de variabilidad predeterminada III

Introducción

0142 Los siguientes experimentos se realizaron para demostrar la protección de una región/regiones de una secuencia de nucleótidos contra degradación con exonucleasas. La idea era ser capaz de proteger regiones en un gen de recombinación en una reacción FIND™ mediante el mantenimiento la secuencia original en estas regiones sin digerir por exonucleasas. En la siguiente reacción FIND™ estas regiones sin digerir son siempre de tipo parental y por lo tanto no recombinadas.

15

Diseño experimental

0143 Se llevaron a cabo dos PCRs separados, con un cebador biotinilado y un cebador sin modificar, para crear dos productos PCR diferentes usados como plantillas para la preparación de ADNss (ver tabla 14 y 15). Después de la preparación de ADNss, los dos ADNss resultantes de diferentes tamaños y polaridades se hibridaron. La molécula híbrida resultante fue luego tratada con Exonucleasa I y Exonucleasa VII, respectivamente, y los productos de digestión se ejecutan en un gel de agarosa para evaluar los resultados del experimento (ver figura 4).

20

Tabla 14

Cebadores usados para hacer productos y polaridad del ADNss correspondiente				
Producto PCR	Longitud	Cebador 1	Cebador 2	Polaridad del ADNss
CT 17 760bp	760 bp	127_5'VH biotina	49_3' smuc 159-	sentido
CT 17 285bp	285 bp	149_5'CDR3VH-, biotina	145_3'CDR1L	Antisentido

Tabla 15

Secuencias de cebadores	
Nombre de cebador	Secuencia de cebador
127 5'VH	5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCT
49 3'smuc159-biotina	5'Biotina-CAGCTTGGTTCCTCCGCCGAA
149 5'CDR3VH-biotina	5'Biotina-CGTGTATTACTGTGCGAGAGT
145 3'CDR1VL	5'TCCTGGGAGCTGCTGATACCA

Material y métodos

0144

5 **Tabla 16**

Amplificación PCR de CT17 760 bp.					
(a)					
	µl	20.5	C		Final
Aq	63.75	1307			
dNTP	16	328	1.25	mM	0.1995
10x tampon	10	205	10	x	0.99751
Cebador 1	5	102.5	20		0.99751
Cebador 2	5	102.5	20	µM	0.99751
Polimerasa ADN	0.25	5.125	5	U/µl	0.012
ADN	0.25		666.5	ng/µl	1.662
Volumen total	100.25	2055			
(b)					
	ADN	Cebador 1	Cebador 2		
1-20	CT17/pFAB5C	127 5'VH	49 3'smuc159-biotina		
21	Control negativo				
(c)					
Programa PCR:					
35x	94°C		30 seg		
	55°C		30 seg		
	72°C		1 min		
Polimerasa ADN Amplitaq (5U/µl), Applied Biosystems					

ES 2 395 249 T3

0145 Los productos PCR son purificados con el sistema de purificación PCR JetQuick (Genomed). Rendimiento total: 52.5 µg, conc: 132.6 ng/µl.

Tabla 17

<i>Amplificación PCR de CT17 760 bp.</i>					
(a)					
	µl	20.5	C		Final
Aq	63.5	1333.5			
dNTP	16	336	1.25	mM	0.2
tampón 10x	10	210	10	x	1
Cebador 1	5	105	20		1
Cebador 2	5	105	20	µM	1
ADN	0.25	5.25	5	U/µl	0.013
Polimerasa					
ADN	0.25		666.5	ng/µl	1.666
Total	100	2100			
Volumen					
(b)					
	<i>ADN</i>	<i>Cebador 1</i>	<i>Cebador 2</i>		
1-20	CT17/pFAB5C	145 5'CDR1VL	149 5'CDR3VH-biotina		
21	Control negativo				
(c)					
Programa PCR:					
1x		94°C			2 min
35x		94°C			1 min
		55°C			30 seg
		72°C			1 min
1x		72°C			7 min
Polimerasa ADN Amplitaq (5U/µl), Applied Biosystems					

5

0146 Productos PCR son purificados con el sistema de purificación PCR JetQuick (Genomed).

Tabla 18

Preparación ADNss de CT17 760 bp y CT17 285 bp.							
Preparación ADNss con el kit MACS Streptavidin (Miltenyi Biotec, GTF)							
Muestra	ADNds	Conc.	Longitud (ng/μL) (bp) x	Numero de ADNds bp	Cantidad de ADNds 0,066* (μg) (μl)	ADNds volumen	Volumen de perlas x 5** (μL)
1	CT17 760bp	132.6	760	50.16	52.1	394	150
2	CT17 285bp	52.8	285	18.81	21.1	400	450

* 100μl de perlas se unen a Xμg de ADN (X=numero de bp x 0.0066. **Perlas son añadidas en exceso 5x

- 5
- La columna fue equilibrada con “tampón de equilibrado para aplicaciones de ácidos nucleicos” y 2x100 μl B&W 1x (5 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) fueron posteriormente hechos pasar a través de la columna.
 - El ADNds fue mezclado con perlas y aplicado.
 - La columna fue lavada 4 veces con B&W 100 μl 1x y el ADNss fue eluido con 150 μl NaOH 0.1 M (almacenado a -20°C, recién descongelado) después de lo cual se agregó 45 μl HCl 0.33 M y 15 μl Tris-HCl 1M pH 8.0 al eluido para neutralizar el ADNss.

10 *Purificación del ADNss del gel con Recochip (TaKaRa)*

0147 65 μl de ADNss/pocillo se pasaron durante 60 min a 100V en un gel de agarosa 1% /TAE 1x. Se insertó Recochip y se pasó durante 10 + 2 min. con polaridad invertida. El contenido de ADN en el recochip fue verificado por UV. El recochip fue retirado a un tubo (proporcionado) y el tubo fue centrifugado durante 5 seg a 5000 rpm. Después de precipitado con 2.5 vol. EtOH al 95% y 0.1 vol. de NaAc 3 M pH 4.6 CT17 760 y CT17 285 fueron disueltos en 50μl y 35μl de Tris 10mM pH 8.0 respectivamente.

15

Tabla 19

<i>Ensayo de hibridación en Tris 10mM o PCR-tampón p64, 15-HeT</i>			
CT17 760bp: CT17 285bp se hibridan en una relación molar de 1:2			
<i>1.10mM Tris</i>	<i>Volumen 2.</i>	<i>Tampón PCR</i>	<i>Volumen</i>
75ng CT17 760bp	1.46μl	75ng CT17 760bp	1.46μl
75ng CT17 760bp	1.46μl	75ng CT17 760bp	1.46μl
58ng CT17 285bp	0.8μl	58ng CT17 285bp	0.8μl
Tris 10mM, pH 8.0	7.74μl	10x tampón PCR	1.0μl
		H2O	6.47μl
Volumen total	10.0μl	Volumen total	10.0μl

0148 Se hibridaron muestras en una máquina PCR a 95°C durante 5 minutos, seguido de un paso heterodúplex, consistente de 45 ciclos de 1 minuto cada uno donde la temperatura se reduce en 1% por cada ciclo después de lo cual las muestras se ejecutaron en un en gel de agarosa 1.5%.

20

Tabla 20

<i>Hibridación en tampón PCR.</i>	
CT17 760bp y CT17 285bp se hibridaron en una relación molar de 1:2	
<i>1.</i>	<i>Volumen</i>
1µg CT17 760bp	19.5µl
0.769µg CT17 285bp	10.6µl
Tampón PCR 10x	4.0µl
H ₂ O	5.9µl
Volumen total	40µl

0149 La concentración final de ADN en la muestra fue 44ng/µl.

5 0150 La muestra se hibridó en una máquina PCR a 95°C durante 5 minutos, seguido por un paso heterodúplex, consistiendo de 45 ciclos de 1 minuto cada uno donde la temperatura se reduce en 1% para cada ciclo. La precipitación se realizó como se describió anteriormente y el granulado se disolvió en 40µl Tris 10mM, pH 8.

Fragmentación de CT17 760bp-CT17 285 hibridado con Exo I.

0151

Tabla 21

	1	2
ADN	Hibr. CT17 760bp/285bp	Hibr. CT17 760bp/285bp
Concentración (ng/µl)	44	44
Cantidad usada (ng)	748	60

10

Tabla 22

	1	2
H ₂ O	10.76µl	3.1µl
tampón Exol (NEB) 10x	3.5µl	0.5µl
Exol (NEB) 10U/ul	3.74µl	-
ADNss	17.0µl	1.4µl
Total	3.5µl	5µl

15

0152 Exol y ADN hibridado se añadió a la mezcla de agua/tampón pre calentada a 37°C. Para la muestra 1, 17.5µl se eliminaron a los 10 min y 15 min, respectivamente, y se inactivaron con calor durante 10 minutos a 96°C. Para la muestra 2, el volumen total fue retirado e inactivado con calor durante 10 minutos a 96°C después de 15 min. Toda la reacción de control (60ng) y 2.8µl (60ng) de 10 min y 15 min se pasaron sobre gel de agarosa 12%.

Fragmentación de CT17 760bp-CT17 285bp hibridado con Exo VII

0153

Tabla 23

	1	2
ADN	Hibr. CT17 760bp/285bp	Hibr. CT17 760bp/285bp
Concentración (ng/μl)	44	44
Cantidad usada (ng)	748	60

Exo VII

Concentración: 10 U/μl

5 Dilución: 2 U/μl

Producido por: USB

Numero de lote: 108705-005

Tabla 24

	1	2
H ₂ O	12.6μl	3.1μl
tampón Exol 10x *	3.5μl	0.5μl
Exol	1.87μl	-
ADNss	17.0μl	1.4μl
Total	35μl	5μl
* tampón Exo VII 10X: Tris 500mM, HCl, pH 7.9, fosfato de potasio 500mM, pH 7.6, EDTA 83mM, B-Mercaptoetanol 100xmM		

- 10
- H₂O y tampón son pre calentados durante 10 min a 37°C.
 - Se añade ExoVII.
 - Se añade ADN híbridizado.
 - Para la muestra 1, 17.5 μl se retiran a los 20 min y 30 min, respectivamente, y se inactivan por calor durante 10 minutos a 96°C.
- 15
- Para la muestra 2, el volumen total es retirado a los 30 min e inactivado con calor durante 10 minutos a 96°C.
 - Toda la reacción de control (60ng) y 2.8μl (60ng) de 20 min y 30 min se ejecutan en gel de agarosa 1.2%.

Resultados

Preparación de ADNss

- 20
- 0155 Dos reacciones PCR separadas se hicieron para producir los siguientes productos PCR: CT17 760bp (3' biotinilado) y CT17 285 (5' biotinilado). De estas plantillas de ADNds fue preparado el ADNss (ver Material y Métodos, arriba).

Ensayo de hibridación de CT17 760bp y CT17 285bp

0156 Dos tampones de hibridación diferentes fueron evaluados: Tris 10mM pH 8.0 y tampón PCR 1x (Applied Biosystems) (ver Material y Métodos). Todas las reacciones fueron ejecutadas en un gel en agarosa (ver figura 5).

Hibridación de CT17 760bp y CT17 285 y digestión con Exol y ExoVII

- 5 0157 CT17 760bp y CT17 285bp fueron hibridados en tampón PCR 1x con una relación molar 1:5 y luego digeridos con Exol y ExoVII en dos reacciones separadas (ver Materiales y Métodos).

0158 60 ng de cada producto de digestión se pasaron sobre un gel de agarosa (ver figura 6).

Discusión

- 10 0159 La hibridación de ensayo de los dos fragmentos claramente muestra que la hibridación ocurre en la muestra que ha sido hibridada en tampón PCR, donde vemos una banda que corresponde al híbrido, con una región de ADNds y una proyección de ADNss en ambos lados. Esta banda es más pequeña que el tamaño esperado, 760bp, pero esto es probablemente debido a propiedades de migración alteradas conferidas por las proyecciones del ADNss. El ADNss migra diferentemente del ADNds en un gel de agarosa, a menudo migrando a cerca de la mitad del tamaño del ADNds correspondiente.

- 15 0160 No ha habido ninguna hibridación en la otra muestra, donde sólo vimos las bandas que corresponden a las dos ADNss originales. Esto demuestra que la fuerza iónica del tampón PCR es adecuada mientras que Tris 10mM no es suficiente para que tenga lugar la hibridación. Todas las demás hibridaciones se hicieron en tampón PCR.

- 20 0161 Las digestiones con Exo I y Exo VII dan lo resultados esperados: Exo I, que sólo digiere desde 3'→5', deja una banda donde el ADNss que sobresale en el extremo 5' está aún presente pero es eliminado en el extremo 3'. Esta banda es de nuevo más pequeña que el tamaño esperado (558bp) pero el ADNss que sobresale en el extremo 5' probablemente altera el patrón de movilidad en el gel. Exo VII, que digiere desde 5'→3' y 3'→5', elimina todo el ADNss que sobresale y deja sólo una banda ADNds de 285 bp.

0162 Estos experimentos claramente muestran que por hibridación con un ADNss complementario, áreas seleccionadas en una secuencia de nucleótidos pueden ser protegidas de la digestión con exonucleasas.

25 LISTA DE SECUENCIAS

0163

<110> Alligator Bioscience AB

<120> Un método para la evolución molecular in vitro de la función de proteína

<130> ALLBA/P36652PC

- 30 <150> 0523582.5

<151> 19 de Noviembre de 2005

<160> 21

<170> seqwin99

<210> 1

- 35 <211> 44

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 1736 cebador delantero sfil

- 40 <400> 1

attactcgcg gccagccgg ccatggcca caggtaagc tcga 44

<210> 2

<211> 35

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> 1735 cebador inverso NotI

5 <400> 2
ttagagcctg cggccgcctt gtcacgtcg tcctt 35
<210> 3
<211> 44
<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> 1644 cebador delantero sfil
<400> 3
attactcgcg gccagccgg ccatggccca caggtaagc tcga 44

15 <210> 4
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

20 <223> 1635 cebador inverso NotI
<400> 4
ttagagcctg cggccgcctt gtcacgtcg tcctt 35
<210> 5
<211> 45

25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR 137
<400> 5

30 cgcaattgg cccagccggc catggccgag gtcagctgt tggag 45
<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> cebador PCR 138
<400> 6

agatggggga ctagtgctgc tcacggtgac. 30
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador PCR 350
 <400> 7
 10 cctggagcct ggcggaccca 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> cebador PCR 351
 <400> 8
 gctgggtccg ccaggctcca 20
 <210> 9
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador PCR 354
 25 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> 1..1
 <223> Biotinilado
 <400> 9
 30 gactctcctg tgcagcctct 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador PCR 357
 <220>

<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> Biotinilado
<400> 10
5 ttgtctctgg agatggtgaa 20
<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> cebador PCR 226
<400> 11
ctcactatag ggccaattgg 20
<210> 12
15 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador PCR 415
20 <400> 12
ttcagatctc gaggtgcagc tgttgag 28
<210> 13
<211> 19
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador PCR 224
<400> 13
30 cctattgcct acggcagcc 19
<210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> cebador PCR 332
<220>

<221> Característica miscelánea
 <222> 1..1
 <223> Biotinilado
 <400> 14
 5 cctattgctt acggcagcc 19
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador PCR 333
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> 1..1
 15 <223> Biotinilado
 <400> 15
 ctactatag ggccaattgg 20
 <210> 16
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador PCR 349
 <400> 16
 25 gactctcttg tgcagcctt 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador PCR 352
 <400> 17
 ttgtctctgg agatggtgaa 20
 <210> 18
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador PCR 355

<220>

5 <221> Característica miscelánea

<222> 1..1

<223> Biotinilado

<400> 18

cctggagcct ggccgaccca 20

10 <210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador PCR 356

<220>

<221> Característica miscelánea

<222> 1..1

<223> Biotinilado

20 <400> 19

gctgggtccg ccaggctcca 20

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador PCR 384

<400> 20

cactgccgtg tattactgt 19

30 <210> 21

<211> 18

<212>A DN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> cebador PCR 386

<220>

<221> Característica miscelánea

<222> 1..1

<223> Biotinilado

<400> 21

cagtgtagct tggcccca 18

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para la generación de una secuencia o población de secuencias de polinucleótidos a partir de secuencias de polinucleótidos madre, el método comprendiendo los pasos de
 - 5 (a) proporcionar una primera población de moléculas de polinucleótidos y una segunda población de moléculas de polinucleótidos, la primera y segunda población juntas constituyendo cadenas positivas y negativas de una molécula de polinucleótidos madre;
 - (b) digerir la primera y la segunda población de moléculas de polinucleótidos con una nucleasa para generar fragmentos de polinucleótidos;
 - 10 (c) contactar dichos fragmentos de polinucleótidos generados de las cadenas positivas con fragmentos generados de las cadenas negativas (bajo condiciones que permiten la hibridación de fragmentos); y
 - (d) amplificar los fragmentos que hibridan entre si para generar al menos una molécula de polinucleótidos que difiere en secuencia de la molécula de polinucleótidos madre

en el que el grado de variabilidad de secuencia en una región seleccionada de la al menos una molécula de polinucleótidos producida en el paso (d) es controlado por la adición de uno o más oligonucleótidos de variabilidad predeterminada, cuyos oligonucleótidos hibridan a una secuencia que se encuentra entre, pero excluye, los nucleótidos terminales 3' y 5' de la molécula de polinucleótidos madre.
- 15 2. Un método según la Reivindicación 1 donde los polinucleótidos madre codifican uno o más motivos de proteína.
3. Un método según la Reivindicación 1 o 2 donde la primera y la segunda población de polinucleótidos son ADNc.
4. Un método según la Reivindicación 1, 2 o 3 donde la primera y la segunda población de polinucleótidos son de
 - 20 cadena simple.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la primera población de polinucleótidos consiste de cadenas positivas de secuencias de polinucleótidos madre y la segunda población de polinucleótidos consiste de cadenas negativas de secuencias de polinucleótidos madre.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la primera y la segunda población de
 - 25 polinucleótidos son digeridas separadamente en el paso (b).
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la nucleasa en el paso (b) es una exonucleasa.
8. Un método según la Reivindicación 7 donde la exonucleasa es seleccionada del grupo que consiste de BAL31, exonucleasa I, exonucleasa VII, exonucleasa T7 gen 6, bacteriófago lambda exonucleasa y exonucleasa Rec Jr.
- 30 9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la secuencia de aminoácido alterada de la al menos una secuencia de polinucleótidos producida en el paso (d) es asociada con una propiedad alterada del polipéptido codificado.
10. Un método según una cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 9 donde los oligonucleótidos de variabilidad
 - 35 predeterminada son añadidos antes de o en el paso (b) y donde la nucleasa es específica para polinucleótidos de cadena simple.
11. Un método según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son añadidos después del paso (b) y antes de o en el paso (c).
12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los oligonucleótidos de variabilidad
 - 40 predeterminada comparten al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia interna de una secuencia de polinucleótidos madre, por ejemplo al menos 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad de secuencia.
13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten 100% de identidad de secuencia con la secuencia interna de una secuencia de polinucleótidos madre.
14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los oligonucleótidos de variabilidad
 - 45 predeterminada son de una secuencia de nucleótido única.
15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son de al menos dos secuencias diferentes.
16. Un método según la Reivindicación 15 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son variantes de la misma secuencia interna de una secuencia de polinucleótidos madre.

17. Un método según la Reivindicación 15 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten 100% de identidad de secuencia con, o son variantes de, al menos dos regiones diferentes de los polinucleótidos madre.
- 5 18. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son producidos por PCR propenso a error o usando un sintetizador de oligonucleótidos.
19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son de entre 10 y 500 nucleótidos de longitud.
20. Un método según la Reivindicación 19 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada son de entre 50 y 200 nucleótidos de longitud.
- 10 21. Un método según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 20 donde las secuencias de polinucleótidos madre codifican un ligando.
22. Un método según la Reivindicación 21 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican una secuencia de aminoácido que interactúa, directa o indirectamente, con una molécula biológica.
- 15 23. Un método según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 20 donde las secuencias de polinucleótidos madre codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
24. Un método según la Reivindicación 23 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre, que codifica un polipéptido marco.
- 20 25. Un método según la Reivindicación 23 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican un CDR.
26. Un método según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 20 donde las secuencias de polinucleótidos madre codifican un enzima o fragmento catalíticamente activo del mismo.
- 25 27. Un método según la Reivindicación 26 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican un sitio activo, un sitio modulador o una región implicada en la estabilidad del enzima.
28. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 20 donde las secuencias de polinucleótidos madre codifican un antígeno.
- 30 29. Un método según la Reivindicación 28 donde los oligonucleótidos de variabilidad predeterminada comparten identidad de secuencia con, o son variantes de, una región de las secuencias de polinucleótidos madre que codifican un epítipo.
30. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el paso (c) comprende además añadir secuencias de cebadores que hibridan a los extremos 3' y/o 5' de al menos uno de los polinucleótidos madre bajo condiciones de hibridación.
- 35 31. Un método según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 30 donde, en el paso (b), al menos un parámetro de la reacción usada para la digestión de la primera población de moléculas de polinucleótidos es diferente del (de los) parámetro(s) equivalente(s) usado(s) en la reacción para la digestión de la segunda población de moléculas de polinucleótidos.
- 40 32. Un método según la Reivindicación 31 donde el parámetro de reacción es seleccionado de tipo de nucleasa, concentración de nucleasa, volumen de reacción, duración de la reacción de digestión, temperatura de la mezcla de reacción, pH de la mezcla de reacción, longitud de las secuencias de polinucleótidos madre, la cantidad de moléculas de polinucleótidos madre y la composición de tampón de la mezcla de reacción.
- 45 33. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde las secuencias de polinucleótidos madre han sido sometido a mutagénesis.
34. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde una o ambas de las poblaciones de fragmentos generados en el paso (b) es sometida a mutagénesis.
35. Un método según la Reivindicación 33 o 34 donde la mutagénesis es PCR propenso a error.
- 50 36. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el paso (b) es llevado a cabo para generar poblaciones de fragmentos de cadena simple de longitudes variantes.

37. Un método según la Reivindicación 36 en el que el paso (b) es controlado para generar una población de fragmentos de cadena simple con una longitud promedio de más de 50 nucleótidos aproximadamente.
38. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además el paso de expresar al menos una secuencia de polinucleótidos generada en el paso (d) para producir el polipéptido codificado.
- 5 39. Un método según la Reivindicación 28 que comprende además el paso de ensayar el polipéptido en cuanto a características alteradas.
40. Un método para hacer un polipéptido con propiedades alteradas, el método comprendiendo los siguientes pasos:
- (a) generar formas variantes de un polinucleótido madre usando un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 39;
- 10 (b) expresar los polinucleótidos variantes producidos el paso (a) para producir polipéptidos variantes;
- (c) detectar los polipéptidos variantes para propiedades alteradas; y
- (e) seleccionar un polipéptido con propiedades alteradas de los polipéptidos variantes.

FIGURA 1

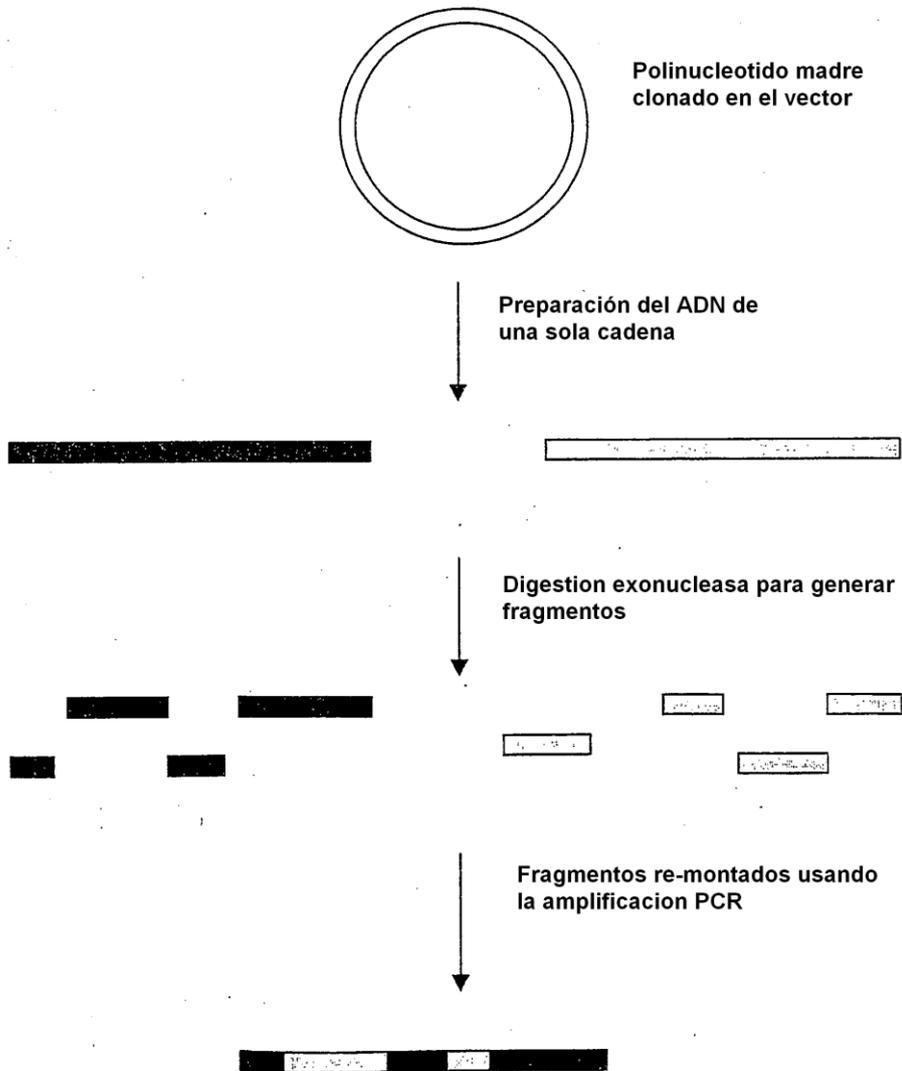


FIGURA 2

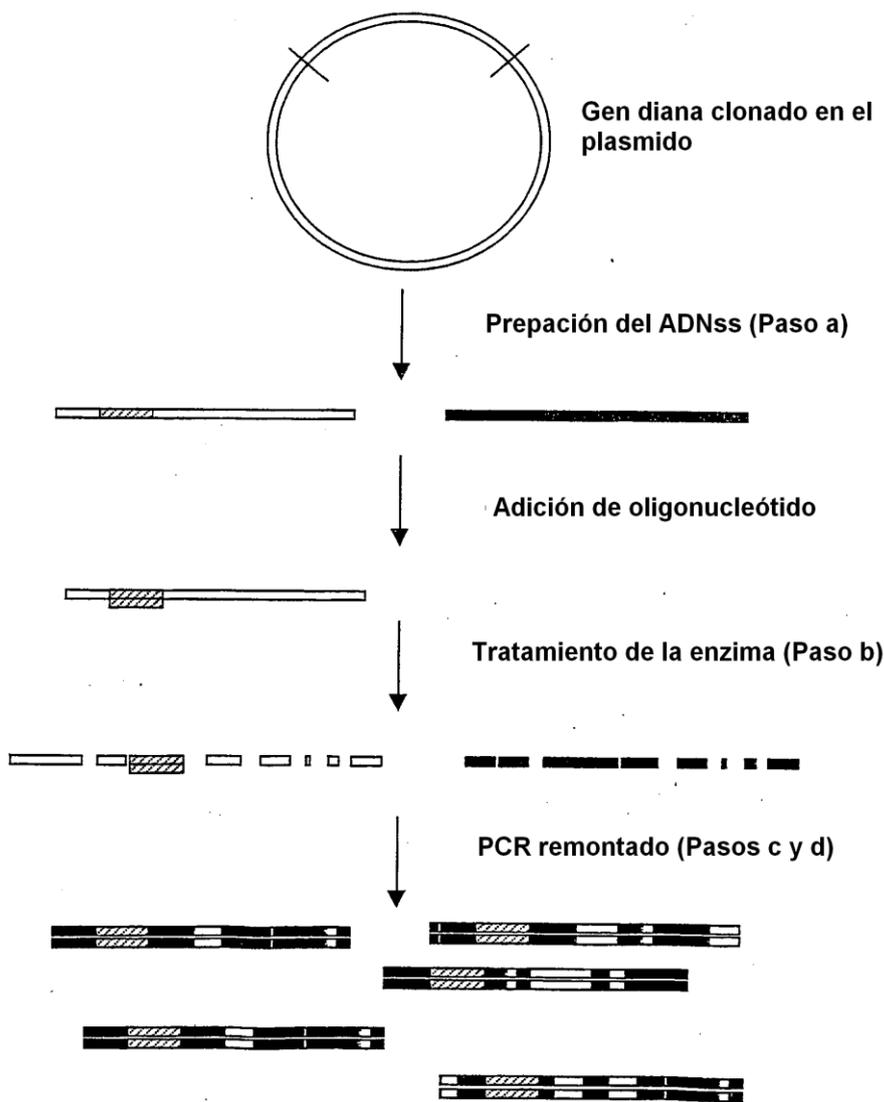


FIGURA 3

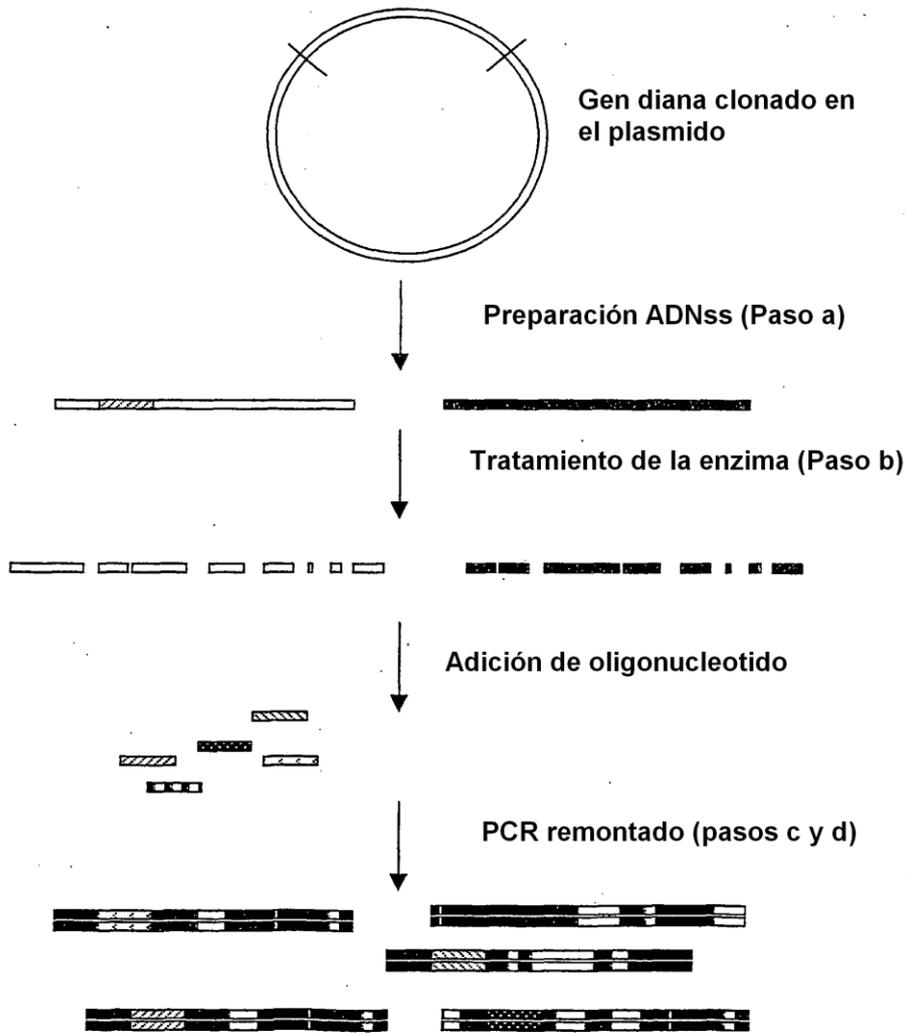


FIGURA 4

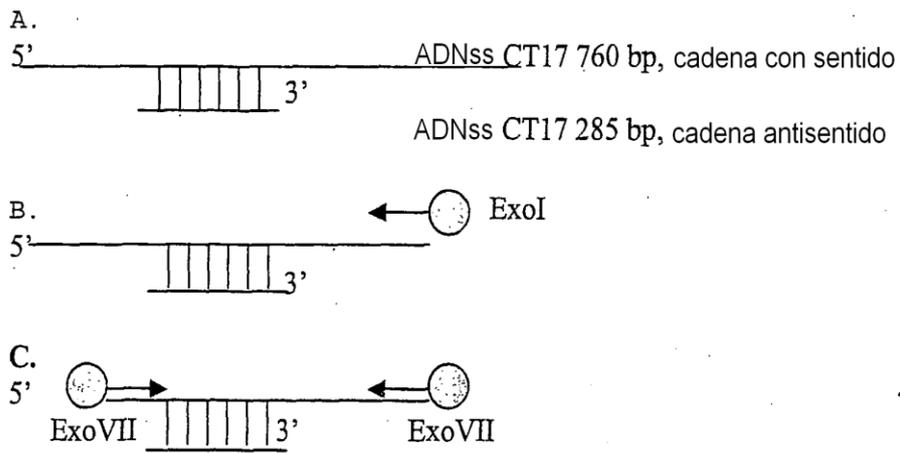


FIGURA 5

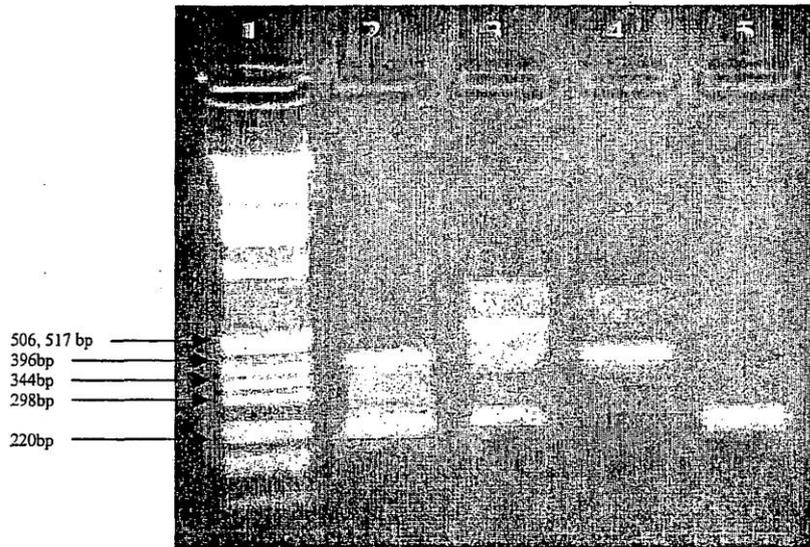


FIGURA 6

