

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 161**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2001 E 01955812 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 1301538**

54 Título: **Polipéptidos de anticuerpos artificiales**

30 Prioridad:

11.07.2000 US 217474 P

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

18.03.2016

73 Titular/es:

**RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES,
INC (100.0%)
101 NORTH WILMOT ROAD, SUITE 600
TUCSON, ARIZONA 85711-3335, US**

72 Inventor/es:

KOIDE, SHOHEI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 161 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

Polipéptidos de anticuerpos artificiales

5 Partes de la presente divulgación se han realizado con el apoyo del Gobierno de los Estados Unidos mediante una subvención de los National Institutes of Health con el número de subvención GM 55042. Por tanto, el Gobierno de los Estados Unidos puede tener algunos derechos de la invención.

Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere de forma general al campo de la producción y selección de polipéptidos de unión y catalíticos mediante los métodos de la biología molecular. La divulgación se refiere específicamente a la generación de bibliotecas de ácidos nucleicos y polipéptidos que codifican la estructura molecular de una molécula modificada de Fibronectina de Tipo III (Fn3). La divulgación se refiere también a "mini anticuerpos artificiales" o "monocuerpos,"
15 es *decir*, polipéptidos que comprenden un armazón Fn3 sobre el que se han injertado regiones bucle que pueden unirse a una variedad de diferentes estructuras moleculares (tales como sitios de unión a anticuerpos).

Antecedentes de la invención

20 Estructura del anticuerpo

Un anticuerpo (Ab, *antibody*) normalizado es una estructura tetramérica que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas de inmunoglobulina (Ig). Las cadenas pesada y ligera de un Ab consisten en diferentes dominios. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL), mientras que cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH) y tres o cuatro dominios constantes (CH) (Alzari *et al.*, 1988). Cada dominio, consistente en ~ 110 restos de aminoácidos, está plegado en una estructura de tipo β-sándwich característica formada por dos láminas β empaquetadas entre sí, el pliegue de la inmunoglobulina. Cada uno de los dominios VH y VL tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1-3) que son bucles, o vueltas, que conectan las hebras β en un extremo de los dominios (Fig. 1: A, C). Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada contribuyen generalmente a la especificidad del antígeno, aunque la contribución de las cadenas individuales a la especificidad no es siempre igual. Las moléculas de anticuerpo han evolucionado para unirse a un gran número de moléculas utilizando seis bucles aleatorios (CDR). Sin embargo, el tamaño de los anticuerpos y la complejidad de los seis bucles representa un obstáculo principal para el diseño si el extremo resultante va a ser un ligando peptídico relativamente pequeño.

35 Subestructuras del anticuerpo

Se pueden preparar subestructuras funcionales de los Ab mediante proteólisis y mediante métodos recombinantes. Incluyen el fragmento Fab, que contiene los dominios VH-CH1 de la cadena pesada y los dominios VL-CL1 de la cadena ligera unidos por un único enlace disulfuro intercadena, y el fragmento Fv, que contiene solamente los dominios VH y VL. En algunos casos, un único dominio VH retiene una afinidad significativa (Ward *et al.*, 1989). Se ha mostrado también que una determinada cadena ligera monomérica κ se unirá específicamente a su antígeno análogo. (L. Masat *et al.*, 1994). Se ha encontrado a veces que las cadenas ligera o pesada separadas retienen algo de la actividad de unión a antígeno (Ward *et al.*, 1989). Estos fragmentos de anticuerpos no son adecuados para el análisis estructural utilizando espectroscopia de RMN debido a su tamaño, solubilidad baja o estabilidad conformacional baja.

Otra subestructura funcional es un Fv monocatenario (scFv, *single chain Fv*), compuesto por las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina, unidas covalentemente por un enlazador peptídico (S-z Hu *et al.*, 1996). Estas proteínas pequeñas (*M*, 25.000) retienen generalmente la especificidad y la afinidad por el antígeno en un único polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas específicas de antígeno más grandes. Algunos grupos han notificado estudios de biodistribución en ratones atómicos xenoinjertados utilizando scFv reactivo contra una variedad de antígenos tumorales en los que se ha observado una localización específica del tumor. Sin embargo, la corta persistencia de los scFv en la circulación limita la exposición de las células tumorales a los scFv, lo que ocasiona límites en el nivel de captación. Como resultado, la captación de tumores por los scFv en estudios animales ha sido generalmente solo de un 1-5 % DI/g a diferencia de los anticuerpos intactos que se pueden localizar en tumores a un 30-40 % de DI/g y que han alcanzado niveles tan elevados como un 60-70 % de DI/g.

60 Se ha diseñado una estructura proteica pequeña denominada "minicuerpo" usando una parte del dominio VH de Ig como plantilla (Pessi *et al.*, 1993). Se han identificado minicuerpos con elevada afinidad (constante de disociación (K_d) ~ 10^{-7} M) por la interleuquina-6 aleatorizando bucles correspondiente a CDR1 y CDR2 de VH y seleccionando a continuación mutantes usando el método de expresión en fago (Martin *et al.*, 1994). Estos experimentos han demostrado que la esencia de la función del Ab podría transferirse a un sistema más pequeño. Sin embargo, el minicuerpo ha heredado la solubilidad limitada del dominio VH (Bianchi *et al.*, 1994).

Se ha notificado que los camellos (*Camelus dromedarius*) carecen a menudo de dominios variables de la cadena ligera cuando se analiza material de tipo IgG obtenido de su suero, lo que sugiere que se puede derivar una especificidad y afinidad del anticuerpo suficientes solamente a partir de los dominios VH (tres bucles CDR). Davies y Riechmann han demostrado recientemente que se pueden generar dominios VH "camelizados" con elevada afinidad ($K_d \sim 10^{-7}$ M) y elevada especificidad aleatorizando solamente la CDR3. Para aumentar la solubilidad y suprimir la unión no específica, se han introducido tres mutaciones en la región marco (Davies y Riechmann, 1995). No se ha mostrado definitivamente, sin embargo, que se pueda usar la camelización, por lo general, para aumentar la solubilidad y la estabilidad de las VH.

Una alternativa al "minicuerpo" es el "diacuerpo". Los diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpos bivalentes y biespecíficos, es decir, tienen dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos contienen un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Los diacuerpos tienen un tamaño similar a un fragmento Fab. Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos quiméricos, o "diacuerpos", son bivalentes y biespecíficos (P. Holliger *et al.*, 1993).

Debido al desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales, un gran número de estructuras 3D de fragmentos de Ab en los estados complejo y/o libre se han resuelto mediante cristalografía de rayos X (Webster *et al.*, 1994; Wilson y Stanfield, 1994). El análisis de las estructuras de Ab ha revelado que cinco de las seis CDR tienen un número limitado de conformaciones de la estructura peptídica, lo que permite, por tanto, predecir la conformación estructural de las CDR utilizando las denominadas estructuras canónicas (Lesk y Tramontano, 1992; Rees *et al.*, 1994). El análisis ha revelado también que la CDR3 del dominio VH (VH-CDR3) tiene usualmente la superficie de contacto más grande y que su conformación es demasiado diversa para que se puedan definir estructuras canónicas; VH-CDR3 también se conoce por tener una gran variación en su longitud (Wu *et al.*, 1993). Por tanto, las estructuras de regiones cruciales de la interfaz Ab-antígeno siguen necesitando determinarse experimentalmente.

La comparación de las estructuras cristalinas entre los estados libre y complejo ha revelado algunos tipos de reordenamientos conformacionales. Entre estos se incluyen reordenaciones de las cadenas secundarias, movimientos segmentales, reordenaciones importantes de VH-CDR3 y cambios en la posición relativa de los dominios VH y VL (Wilson y Stanfield, 1993). En el estado libre, se espera que las CDR, en particular las que experimentan grandes cambios conformacionales tras la unión, sean flexibles. Debido a que la cristalografía de rayos X no es adecuada para la caracterización de partes flexibles de moléculas, no han sido posibles estudios estructurales en estado de solución que proporcionen imágenes dinámicas de la conformación de los sitios de unión a antígenos.

Imitación del sitio de unión a anticuerpo

Se han preparado péptidos de CDR y miméticos orgánicos de CDR (Dougall *et al.*, 1994). Los péptidos de CDR son péptidos cortos, normalmente cíclicos, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de los bucles de las CDR de los anticuerpos. Los bucles de las CDR son responsables de las interacciones anticuerpo-antígeno. Los miméticos orgánicos de las CDR son péptidos que corresponden a los bucles de CDR que se unen a una estructura principal, *por ejemplo*, un compuesto orgánico pequeño.

Los péptidos de las CDR y los miméticos orgánicos de las CDR han mostrado retener algo de la afinidad de unión (Smyth y von Itzstein, 1994). Sin embargo, como era de esperar, son demasiado pequeños y demasiado flexibles para mantener una afinidad y especificidad completas. Se han injertado CDR de ratón en un marco de Ig humana sin pérdida de afinidad (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988), cree que esta "humanización" no resuelve los problemas anteriormente mencionados específicos de los estudios en disolución.

Imitación de los procesos de selección natural de los Ab

En el sistema inmunitario, los Ab específicos se seleccionan y amplifican a partir de una biblioteca grande (maduración por afinidad). Los procesos se pueden reproducir *in vitro* utilizando tecnologías de bibliotecas combinatorias. La expresión satisfactoria de fragmentos de Ab sobre la superficie de bacteriófagos ha posibilitado generar y cribar un gran número de mutaciones de la CDR (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Winter *et al.*, 1994). Se produce un número creciente de Fab y Fv (y sus derivados) mediante esta técnica, proporcionando una rica fuente para estudios estructurales. La técnica combinatoria puede combinarse con miméticos de Ab.

Numerosos dominios de proteínas que podrían servir potencialmente como estructuras principales de proteínas se han expresado como fusiones con proteínas de cápsidas de fagos. Revisión en Clackson y Wells, Trends Biotechnol. 12:173-184 (1994). De hecho, algunos de estos dominios de proteínas se han utilizado ya como estructuras principales para expresar secuencias peptídicas aleatorias, incluyendo el inhibidor de la tripsina pancreática de bovino (Roberts *et al.*, PNAS 89:2429-2433 (1992)), la hormona del crecimiento humana (Lowman *et*

al., *Biochemistry* 30:10832-10838 (1991)), Venturini et al., *Protein Peptide Letters* 1:70-75 (1994)), y el dominio de unión de la IgG de *Streptococcus* (O'Neil et al., *Techniques in Protein Chemistry V* (Crabb, L., ed.) pp. 517-524, Academic Press, San Diego (1994)). Estas estructuras principales han expresado un único bucle o región al azar.

5 Los investigadores han utilizado el pequeño inhibidor de la α -amilasa de 74 aminoácidos Tendamistat como estructura de presentación sobre el fago filamentoso M13 (McConnell y Hoess, 1995). Tendamistat es una proteína de lámina β de *Streptomyces tendae*. Tiene numerosas características que la convierten en una estructura principal atractiva para péptidos, incluyendo su pequeño tamaño, estabilidad, y la disponibilidad de datos estructurales de RMN y rayos X de alta resolución. La topología global de Tendamistat es similar a la de un dominio de inmunoglobulina, con dos laminas β conectadas por una serie de bucles. A diferencia de los dominios de inmunoglobulina, las láminas β de Tendamistat se mantienen juntas por dos enlaces disulfuro, en lugar de uno, que es responsable de la importante estabilidad de la proteína. Por analogía con los bucles de las CDR que se encuentran en las inmunoglobulinas, los bucles de Tendamistat pueden servir a una función similar y se pueden aleatorizar en la mutagénesis in vitro.

15 Tendamistat, sin embargo, se deriva de *Streptomyces tendae*. De esta manera, aunque Tendamistat puede ser antigénico en seres humanos, su pequeño tamaño puede reducir o inhibir su antigenicidad. Asimismo, no se conoce con seguridad la estabilidad de Tendamistat. Además, la estabilidad que se ha notificado para Tendamistat se atribuye a la presencia de dos enlaces disulfuro. Los enlaces disulfuro, sin embargo, son una significativa desventaja para dichas moléculas porque pueden romperse en condiciones reductoras y deben formarse adecuadamente para tener una estructura proteínica útil. Además, el tamaño de los bucles en Tendamistat es relativamente pequeño, limitando de esta manera el tamaño de las inserciones que se pueden acomodar en la estructura. Además, es bien sabido que la correcta formación de los enlaces disulfuro en péptidos recién sintetizados no es directa. Cuando se expresa una proteína en el espacio citoplásmico de *E. coli*, el hospedador bacteriano más común para la expresión en exceso de proteínas, no se forman usualmente enlaces disulfuro, haciendo potencialmente difícil preparar grandes cantidades de moléculas diseñadas mediante ingeniería.

25 De esta manera, existe una necesidad continuada de anticuerpos artificiales monocatenarios pequeños para una variedad de aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y catalíticas. En particular, existe una necesidad continuada de anticuerpos artificiales que sean estructuralmente estables a pH neutro.

Sumario

35 En un aspecto, la presente invención proporciona un monocuerpo polipeptídico de fibronectina de tipo III (Fn3) que comprende una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que una o más secuencias de la región bucle del monocuerpo varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural; en el que el monocuerpo polipeptídico Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el que dicha mutación estabilizante aumenta el punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el monocuerpo de Fn3 de acuerdo con la invención.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un casete de expresión unido operativamente a la molécula de ácido nucleico de la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora transformada con el vector de la invención.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un monocuerpo polipeptídico de fibronectina de tipo III (Fn3) que comprende las etapas de: (a) proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle; (b) preparar cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) suficientemente complementarios de una secuencia bucle de forma que se pueda hibridar en las condiciones de la PCR, en el que al menos uno de los cebadores contiene una secuencia de ácido nucleico que se va a insertar en el ADN; (c) llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa utilizando la secuencia de ADN de (a) y los cebadores de (b); (d) hibridar y extender los productos de reacción de (c) para obtener un producto de ADN; y (e) expresar el monocuerpo polipeptídico codificado por el producto de ADN de (d), en el que el monocuerpo polipeptídico Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el que dicha mutación estabilizante aumenta el

punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un monocuerpo polipeptídico de fibronectina de tipo III (Fn3) que comprende las etapas de: a) proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle; b) llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio de al menos una región bucle para crear una secuencia de ADN que comprende una mutación de inserción; y c) expresar el monocuerpo polipeptídico codificado por la secuencia de ADN que comprende la mutación de inserción; en el que el monocuerpo polipeptídico
10 Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el que dicha mutación estabilizante aumenta el punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo
15 polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una biblioteca de ácidos nucleicos variada que codifica monocuerpos de los polipéptidos Fn3 que comprenden una pluralidad de especies de ácidos nucleicos comprendiendo cada una de ellas una pluralidad de regiones bucle, en el que las especies codifican una pluralidad
20 de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que una o más secuencias de la región bucle varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al menos dos aminoácidos procedentes de secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural; en el que el monocuerpo polipeptídico Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un
25 resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el que dicha mutación estabilizante aumenta el punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona una biblioteca de expresión de péptidos generada utilizando la biblioteca de ácidos nucleicos variados de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar la secuencia de aminoácidos de una molécula de polipéptido que se une a un compañero de unión específico (SBP) para formar un complejo polipéptido:SBP en el que la constante de disociación del polipéptido: complejo SBP es menor de 10^{-6} moles/litro, que comprende las etapas de: a) proporcionar una biblioteca de expresión de péptidos de acuerdo con la invención; b) poner en contacto la biblioteca de expresión de péptidos de (a) con un SBP inmovilizado o separable; c) separar los complejos péptido:SBP de los péptidos libres, d) producir la replicación de los péptidos separados de (c) para dar como resultado una nueva biblioteca de expresión de péptidos que se distingue de la citada en (a) por tener una diversidad disminuida y por estar enriquecida en péptidos expresados que se unen al SBP; e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c), y (d) con la nueva biblioteca de (d); y f) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica el péptido expresado de una especie de (d) y deducir la secuencia peptídica que se une al SBP.
35
40

La presente divulgación proporciona una molécula de fibronectina de tipo III (Fn3), en la que la Fn3 contiene una mutación estabilizante. Una mutación estabilizante se define en el presente documento como una modificación o cambio en la secuencia de aminoácidos de la molécula de Fn3, tal como la sustitución de un aminoácido por otros, que aumenta el punto de fusión de la molécula en más de 0,1 °C en comparación con una molécula que es idéntica excepto por el cambio. Como alternativa, el cambio puede aumentar el punto de fusión en más de 0,5 °C o incluso 1,0 °C o más. Se proporciona un método para determinar el punto de fusión de moléculas de Fn3 en el Ejemplo 19
45
50 siguiente.

La Fn3 puede tener al menos un resto de ácido aspártico (Asp) y/o al menos un resto de ácido glutámico (Glu) que se ha eliminado o sustituido con al menos uno de diferentes restos de aminoácidos. Por ejemplo, Asp 7 y/o Asp 23 y/o Glu 9, pueden haberse eliminado o sustituido con al menos uno de diferentes restos de aminoácidos. Asp 7, Asp 23, o Glu 9, pueden haberse sustituido con un resto asparagina (Asn) o lisina (Lys). La presente divulgación proporciona además una molécula de ácido nucleico y un vector de expresión que codifica una molécula de Fn3 en la que Fn3 contiene una mutación estabilizante.
55

La divulgación proporciona un monocuerpo polipeptídico de fibronectina de tipo III (Fn3) que contiene una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante. Una o más de las secuencias del monocuerpo de la región bucle del polipéptido Fn3 varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural. Los dominios de la hebra β del monocuerpo tienen al menos aproximadamente una homología del 50 % de la secuencia de aminoácidos total con respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente a las secuencias del dominio de la hebra β de Fn3' natural. Preferentemente, una o más de las regiones bucle del monocuerpo contienen restos de aminoácidos:
60
65

- i) desde el 15 al 16 inclusive en un bucle AB;
- ii) desde el 22 al 30 inclusive en un bucle BC;
- iii) desde el 39 al 45 inclusive en un bucle CD;
- 5 iv) desde el 51 al 55 inclusive en un bucle DE;
- v) desde el 60 al 66 inclusive en un bucle EF; y
- vi) desde el 76 al 87 inclusive en un bucle FG.

10 La divulgación proporciona también una molécula de ácido nucleico que codifica un monocuerpo polipeptídico Fn3 en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante, así como un vector de expresión que contiene la molécula de ácido nucleico y una célula hospedadora que contiene el vector.

15 La divulgación proporciona además un método para preparar un monocuerpo polipeptídico Fn3 en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante. El método incluye proporcionar una secuencia de ADN que codifica una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que al menos una región bucle de la secuencia contiene un único sitio para la enzima de restricción. La secuencia de ADN se escinde en el único sitio de restricción. A continuación, un segmento de ADN preseleccionado se inserta en el sitio de restricción. El segmento de ADN preseleccionado codifica un péptido que puede unirse a un compañero de unión específico (SBP) o un compuesto análogo en el estado de transición (TSAC).
 20 La inserción del segmento de ADN preseleccionado en la secuencia de ADN da como resultado una molécula de ADN que codifica un monocuerpo polipeptídico que tiene una inserción. La molécula de ADN se expresa a continuación de tal manera que da como resultado el monocuerpo polipeptídico.

25 Se proporciona también un método para preparar un monocuerpo polipeptídico Fn3 en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante, método que incluye proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que se conoce la secuencia de nucleótidos de al menos una región bucle. Se proporcionan o preparan cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que son suficientemente complementarios de la secuencia bucle conocida para poderse hibridar en condiciones de la PCR, en el que al menos uno de los
 30 cebadores contiene una secuencia de ácido nucleico modificada que se va a insertar en el ADN. Se llevó a cabo la PCR utilizando la secuencia de ADN replicable y los cebadores. A continuación se expresó el producto de reacción de la PCR para obtener un monocuerpo polipeptídico.

35 La divulgación proporciona un método adicional para preparar un monocuerpo polipeptídico Fn3 en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante. El método incluye proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que se conoce la secuencia de nucleótidos de al menos una región bucle. Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a sitio de al menos una región bucle para crear una mutación de inserción. A continuación se expresó el ADN resultante que incluye la mutación de inserción.

40 Se proporciona además una biblioteca variada de ácido nucleico que codifica los monocuerpos de los polipéptidos de Fn3 incluyendo una pluralidad de especies de ácido nucleico que codifican una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que una o más secuencias de la región bucle del monocuerpo varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al
 45 menos dos aminoácidos procedentes de secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural, y en el que los dominios de las hebras β del monocuerpo tienen al menos una homología del 50 % de la secuencia de aminoácidos total con respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente a las secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 natural, y en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante. La divulgación proporciona también una biblioteca de expresión de péptidos derivada de la biblioteca de ácidos nucleicos variados de la invención.
 50 Preferentemente, el péptido de la biblioteca de expresión de péptidos se expresa sobre la superficie de un bacteriófago, *por ejemplo*, un bacteriófago M13 o un bacteriófago fd, o un virus.

55 La invención proporciona también un método para identificar la secuencia de aminoácidos de una molécula de polipéptido que puede unirse a un compañero de unión específico (SBP) para formar un complejo polipéptido:SBP, en el que la constante de disociación del complejo polipéptido:SBP es menor de 10^{-6} moles/litro. El método incluye las etapas de:

- a) proporcionar una biblioteca de expresión de péptidos de la invención;
- b) poner en contacto la biblioteca de expresión de péptidos de (a) con un SBP inmovilizado o separable;
- 60 c) separar los complejos péptido:SBP de los péptidos libres;
- d) producir la replicación de los péptidos separados de (c) para dar como resultado una nueva biblioteca de expresión de péptidos que se distingue de la citada en (a) por tener una diversidad disminuida y por estar enriquecida en péptidos expresados que se pueden unir al SBP;
- e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c), y (d) con la nueva biblioteca de (d); y
- 65 f) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica el péptido expresado de una especie de (d) y deducir la secuencia peptídica que se puede unir al SBP.

La presente divulgación proporciona también un método para preparar una biblioteca de ácido nucleico variada que codifica los monocuerpos del polipéptido Fn3 que tienen una pluralidad de especies de ácidos nucleicos incluyendo cada una de ellas una pluralidad de regiones bucle, en el que las especies codifican una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que una o más secuencias de la región bucle varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al menos dos aminoácidos procedentes de secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural, y en el que las secuencias del dominio de la hebra β del monocuerpo tienen una homología del 50 % de la secuencia de aminoácidos total con las correspondientes secuencias de aminoácidos de las secuencias del dominio de la hebra β del Fn3 natural, y en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante, incluyendo las etapas de

- a) preparar un polipéptido de Fn3 que tiene una secuencia predeterminada;
- b) poner en contacto el polipéptido con un compañero de unión específico (SBP, *specific binding partner*) para formar un complejo polipéptido:SBP en el que la constante de disociación del complejo polipéptido:SBP es menor de 10^{-6} moles/litro;
- c) determinar la estructura de la unión del complejo polipéptido:SBP mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X; y
- d) preparar la biblioteca de ácidos nucleicos variados, en la que la variación se lleva a cabo en posiciones de la secuencia de ácido nucleico que, según la información proporcionada en (c), da como resultado uno o más polipéptidos con una unión al SBP mejorada.

Se proporciona también un método para identificar la secuencia de aminoácidos de una molécula de polipéptido que puede catalizar una reacción química con una constante de velocidad catalizada, k_{cat} , y una constante de velocidad sin catalizar, k_{unecat} , de tal manera que el cociente k_{cat}/k_{unecat} sea mayor de 10. El método incluye las etapas de:

- a) proporcionar una biblioteca de expresión de péptidos de la invención;
- b) poner en contacto la biblioteca de expresión de péptidos de (a) con un compuesto análogo en el estado de transición inmovilizado o separable (TSAC) que representa el estado de transición molecular aproximado de la reacción química;
- c) separar los complejos péptido:TSAC de los péptidos libres;
- d) producir la replicación de los péptidos separados de (c) para dar como resultado una nueva biblioteca de expresión de péptidos que se distingue de la citada en (a) por tener una diversidad disminuida y por estar enriquecida en péptidos expresados que se pueden unir al TSAC;
- e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c), y (d) con la nueva biblioteca de (d); y
- f) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica el péptido expresado de una especie de (d) y deducir la secuencia peptídica.

La divulgación proporciona también un método para preparar una biblioteca de ácido nucleico variada que codifica los monocuerpos del polipéptido Fn3 que tienen una pluralidad de especies de ácidos nucleicos incluyendo cada una de ellas una pluralidad de regiones bucle, en el que las especies codifican una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que una o más secuencias de la región bucle varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al menos dos aminoácidos procedentes de secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural, y en el que las secuencias del dominio de la hebra β del monocuerpo tienen una homología del 50 % de la secuencia de aminoácidos total con las correspondientes secuencias de aminoácidos de las secuencias del dominio de la hebra β del Fn3 natural, y en el que Fn3 contiene una mutación estabilizante, incluyendo las etapas de

- a) preparar un monocuerpo polipeptídico Fn3 que tiene una secuencia predeterminada, en el que el polipéptido es capaz de catalizar una reacción química con una constante de velocidad catalizada, k_{cat} , y una constante de velocidad sin catalizar, k_{unecat} , de tal manera que el cociente k_{cat}/k_{unecat} sea mayor de 10;
- b) poner en contacto el polipéptido con un compuesto análogo en el estado de transición inmovilizado o separable (TSAC) que representa el estado de transición molecular aproximado de la reacción química;
- c) determinar la estructura de unión del complejo polipéptido:TSAC mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X; y
- d) preparar la biblioteca de ácidos nucleicos variados, en la que la variación se lleva a cabo en posiciones de la secuencia de ácido nucleico que, según la información proporcionada en (c), da como resultado uno o más polipéptidos con una unión al TSAC mejorada o una estabilización del TSAC mejorada.

La divulgación proporciona también un kit para determinar el comportamiento de cualquiera de los métodos de la divulgación. La invención proporciona además una composición, por ejemplo, un polipéptido, preparado mediante el uso del kit, o identificado mediante cualquiera de los métodos de la invención.

Las siguientes abreviaturas se han usado en la descripción de aminoácidos, péptidos, o proteínas: Ala o A, Alanina; Arg o R, arginina; Asn o N asparagina; Asp o D, ácido aspártico; Cys o C, cisteína; Gln o Q, glutamina; Glu o E, ácido glutámico; Gly o G, glicina; His o H, histidina; Ile o I, isoleucina; Leu o L, leucina; Lys o K, lisina; Met o M, metionina; Phe o F, fenilalanina; Pro o P, prolina; Ser o S, serina; Thr o T, treonina; Trp o W, triptófano; Tyr o Y, tirosina; Val o V, valina.

Se han utilizado las siguientes abreviaturas en la descripción de ácidos nucleicos, ADN, o ARN: A, adenosina; T, timidina; G, guanosa; C, citosina.

Breve descripción de los dibujos

- 5
- Figura 1. Topología de la hebra β y el bucle (A, B) y representación de MOLSCRIPT (C, D; Kraulis, 1991) del dominio VH de la inmunoglobulina D1.3 dirigida contra lisozima (A, C; Bhat *et al.*, 1994) y el 10^o dominio de tipo III de la fibronectina humana (B, D; Main *et al.*, 1992). Se indican las localizaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, regiones hipervariables) y de la secuencia Erg-Gly-Asp de unión a la integrina (RGD).
- 10
- Figura 2. Secuencia de aminoácidos (SED ID N^o: 110) y sitios de restricción del gen Fn3 sintético. La numeración de los restos sigue lo expuesto en Main *et al.* (1992). Los sitios de la enzima de restricción diseñados se muestran por encima de la secuencia de aminoácidos. Las hebras β se denotan por subrayados. La secuencia "mq" del extremo N se ha añadido para su posterior clonación en un vector de expresión. La proteína de fusión His*tag (Novagen) tiene una secuencia adicional, MGSSHHHHHSSGLVPRGSH (SEC ID N^o:114), que precede a la secuencia Fn3
- 15
- anteriormente mostrada.
- Figura 3. A, Espectros con dicroísmo circular en el UV lejano de Fn3 natural a 25 °C y 90 °C. Se disolvió Fn3 (50 μ M) en acetato de sodio (50 mM, pH 4,6). B, desnaturalización térmica de Fn3 vigilado a 215 nm. Se aumentó la temperatura a una velocidad de 1 °C/min.
- 20
- Figura 4. A, Traza de C_{α} trace de la estructura cristalina del complejo de la lisozima (HEL) y el fragmento Fv del anticuerpo D1.3 dirigido contra la lisozima de la clara de huevo de gallina (anti-HEL) (Bhat *et al.*, 1994). Se muestran también las cadenas secundarias de los restos 99-102 de VH CDR3, que están en contacto con HEL. B, El área superficial de contacto de cada resto de las interacciones D1.3 VH-HEL y VH-VL representada gráficamente frente al número de resto de D 1.3 VH. Se determinaron el área superficial y la estructura secundaria con el programa DSSP (Kabsh y Sander, 1983). C y D, dibujos esquemáticos de la estructura de la lámina β de los restos F-bucle-hebra G de D1.3 VH (C) y Fn3 (D). Los recuadros denotan restos en las hebras β y los óvalos lo que no se encuentran en las hebras. Los recuadros sombreados indican restos en los que se han escondido significativamente cadenas secundarias. Las líneas discontinuas indican enlaces de hidrógeno.
- 25
- Figura 5. Gen Fn3 diseñado mostrando las secuencias de ADN (SEC ID N^o: 111) y aminoácidos (SEC ID N^o: 112). La numeración de los aminoácidos sigue lo expuesto en Main *et al.* (1992). Los dos bucles que se aleatorizaron en bibliotecas combinatorias están encerrados en recuadros.
- 30
- Figura 6. Cartografía del plásmido pAS45. El plásmido pAS45 es el vector de expresión de His*tag-Fn3.
- Figura 7. Cartografía del plásmido pAS25. El plásmido pAS25 es el vector de expresión de Fn3.
- Figura 8. Cartografía del plásmido pAS38. pAS38 es un vector fagémido para la expresión superficial de Fn3.
- 35
- Figura 9. (Ubiquitina-1) Caracterización de la unión específica de ligando de clones enriquecidos utilizando el enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Pocillos de placas de microvaloración se revistieron con ubiquitina (1 μ g/pocillo; "Ligando (+) y a continuación se bloquearon con BSA. La solución de fagos en TBS que contenía aproximadamente 10¹⁰ unidades formadoras de colonias (ufc) se añadió a un pocillo y se lavó con TBS. Los fagos unidos se detectaron con un conjugado de anticuerpo-POD dirigido contra fago (Pharmacia) con Turbo-TMB (Pierce) como sustrato. Se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro SPECTRAMax de Molecular Devices para 250 microplacas. Como control, se utilizaron pocillos sin el ligando inmovilizado. 2-1 y 2-2 denotan clones enriquecidos procedentes de la Biblioteca 2 eluidos con ligando libre y ácido, respectivamente. 4-1 y 4-2 denotan clones enriquecidos procedentes de la Biblioteca 4 eluidos con ligando libre y ácido, respectivamente.
- 40
- Figura 10. (Ubiquitina-2) ELISA de competición de fagos de clones enriquecidos. Soluciones de fagos que contenían aproximadamente 10¹⁰ ufc se incubaron en primer lugar con ubiquitina libre a 4 °C durante 1 hora antes de su unión a un pocillo revestido de ligando. Los pocillos se lavaron y los fagos se detectaron como se ha descrito anteriormente.
- 45
- Figura 11. Elisa de competición de fagos del monocuerpo de unión a ubiquitina 411. Las condiciones experimentales son las mismas que se han descrito anteriormente para la ubiquitina. Se llevó a cabo el ELISA en presencia de ubiquitina libre en la solución de unión. Los experimentos se llevaron a cabo con cuatro preparaciones diferentes del mismo clon.
- 50
- Figura 12. (Fluoresceína-1) ELISA de fagos de cuatro clones, Plb25.1 (que contiene la SEC ID N^o:115), Plb25.4 (que contiene la SEC ID N^o:116), pLB24.1 (que contiene la SEC ID N^o:117) y pLB24.3 (que contiene la SEC ID N^o:118). Las condiciones experimentales son las mismas que con la ubiquitina-1 anterior.
- Figura 13. (Fluoresceína-2) ELISA de competición de los cuatro clones. Las condiciones experimentales son las mismas que con la ubiquitina-2 anterior.
- 55
- Figura 14. Espectro ¹H, ¹⁵N-HSQC del monocuerpo LB25.5 unido a fluorescencia. Se disolvió proteína aproximadamente 20 μ M en tampón acetato de sodio 10 mM (pH 5,0) que contenía cloruro de sodio 100 mM. El espectro se recogió a 30 °C en un espectrómetro de RMN Varian Unity INOVA 600.
- Figura 15. Caracterización de la reacción de unión de Ubi4-Fn3 a la diana, ubiquitina.
- 60
- (a) Análisis ELISA de fagos de la unión de Ubi4-Fn3 a ubiquitina. Se midió la unión de fagos Ubi4 a pocillos revestidos con ubiquitina. Se llevó a cabo el experimento control con pocillos que no contenían ubiquitina.
- (b) ELISA de competición de fagos de Ubi4-Fn3. Se preincubaron fagos Ubi4-Fn3 con ubiquitina soluble a una concentración indicada, seguido por la detección mediante ELISA de fagos en pocillos revestidos con ubiquitina.
- 65
- (c) ELISA de competición de fagos ensayando la especificidad del clon Ubi4. Se preincubaron los fagos Ubi4 con 250 μ g/ml de proteínas solubles, seguido por el ELISA de fagos como en (b).

(d) ELISA usando proteínas libres.

Figura 16. Curvas de equilibrio del desplegamiento de Ubi4-Fn3 (símbolos cerrados) y Fn3 natural (símbolos abiertos). Los cuadrados indican los datos medidos en TBS (tampón Tris HCl (50 mM, pH 7,5) que contiene NaCl (150 mM)). Los círculos indican los datos medidos en tampón Gly HCl (20 mM, pH 3,3) que contiene NaCl (300 mM). Las curvas muestran el mejor ajuste de la curva de transición basado en el modelo de dos estados. En la Tabla 8 se relacionan los parámetros que caracterizan las transiciones.

Figura 17. (a) Espectro de ^1H , ^{15}N -HSQC de [^{15}N]-Ubi4-K Fn3. (b). Diferencia ($\delta_{\text{natural}} - \delta_{\text{Ubi4}}$) de los desplazamientos químicos de ^1H (b) y ^{15}N (c) representados gráficamente frente al número de resto. Los valores para los restos 82-84 (que se muestran como círculos rellenos) que incluyen delecciones de Ubi4-K se ajustaron a cero. Los círculos abiertos indican restos de la proteína Ubi4-K que están mutados. Las ubicaciones de las hebras β se indican con flechas.

Figura 18. (A) desnaturalización inducida por clorhidrato de guanidina (GuHCl) de FNfn10 vigilada por fluorescencia con Trp. Se muestra la intensidad de emisión de la fluorescencia a 355 nm en función de la concentración de GuHCl. Las líneas muestran los mejores ajustes de los datos al modelo de transición en dos estados. (B) Estabilidad de FN3 en GuHCl 4 M representada gráficamente en función del pH. (C) dependencia del pH del valor m.

Figura 19. Espectro bidimensional de H(C)CO de FNfn10 que muestra el desplazamiento químico para ^{13}C del carbono carboxilo (eje vertical) y el desplazamiento para el ^1H de $^1\text{H}^{\beta}$ de Asp o $^1\text{H}^{\gamma}$ de Glu, respectivamente (eje horizontal). Se marcaron los picos cruzados con sus respectivos números de resto.

Figura 20. Desplazamientos dependientes del pH para el ^{13}C de los carbonos carboxilo de los restos Asp y Glu en FNfn10. El Panel A muestra los datos de Asp 3, 67 y 80, y Glu 38 y 47. Las líneas son los mejores ajustes de los datos a la ecuación de Henderson-Hasselbalch con un grupo ionizable (McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Koemer, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W. y Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* 35, 9958-9966). El Panel B muestra los datos de Asp 7 y 23 y Glu 9. Las líneas continuas muestran los mejores ajustes a la ecuación de Henderson-Hasselbalch con dos grupos ionizables, mientras que las líneas punteadas muestran los mejores ajustes a la ecuación con un grupo ionizable.

Figura 21. (A) Se muestra la secuencia de aminoácidos de FNfn10 (SEC ID N°:121) de acuerdo con su topología (Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J., y Campbell, I. D. (1992) *Cell* 71, 671-678). Los restos Asp y Glu están resaltados con círculos grises. Las líneas y flechas delgadas que conectan círculos indican puentes de hidrógeno en la estructura. (B) Un modelo de CPK de FN3 que muestra las localizaciones de Asp 7 y 23 y Glu 9.

Figura 22. La desnaturalización térmica de las proteínas FNfn10 naturales y mutantes a pH 7,0 y 2,4 en presencia de urea 6,3 M y NaCl 0,1 o 1,0 M. El cambio en la señal de dicroísmo circular a 227 nm se representó gráficamente en función de la temperatura. Los círculos sólidos muestran los datos en presencia de NaCl 1 M y los círculos abiertos son los datos en presencia de NaCl 0,1 M. La columna de la izquierda muestra los datos tomados a pH 2,4 y la columna de la derecha a pH 7,0. La identidad de las proteínas se indica en los paneles.

Figura 23. Desnaturalización inducida por GuHCl de los mutantes de FNfn10 vigilados con fluorescencia. Los datos de fluorescencia se convirtieron a la fracción de la proteína sin plegar de acuerdo con el modelo de transición en dos estados (Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. y Makhatazde, G. I. (1999) *Biochemistry* 38, 16419-16423), y se representaron gráficamente en función de GuHCl.

Figura 24. Valoración del pH del ^{13}C del carboxilo resonancia de los restos de Asp y Glu en D7N (círculos abiertos) y D7K (círculos cerrados) de FNfn10. Los datos de los (cruces) naturales se muestran también para comparación. Los nombres de los restos se indican en los paneles individuales.

Descripción detallada

En la pasada década, el sistema inmunitario se ha explicado como una rica fuente de catalizadores *de novo*. Los anticuerpos catalíticos han mostrado tener quimioselectividad, enantioselectividad, aceleraciones a grandes velocidades, e incluso la capacidad de desviar reacciones químicas. En la mayoría de los casos, los anticuerpos se han estimulado a haptenos análogos del estado de transición (TSA). Estos haptenos TSA son compuestos estables de bajo peso molecular diseñados para imitar las estructuras de especies en estado de transición energéticamente inestables que aparecen brevemente (aproximadamente una vida media de 10^{-13} s) en las rutas de reacción entre reactivos y productos. Se cree que los anticuerpos dirigidos contra TSA, como las enzimas naturales, se unen selectivamente y estabilizan el estado de transición, facilitando de esta manera el paso de reactivos a productos. De esta manera, tras la unión, el anticuerpo disminuye la energía del estado de transición real y aumenta la velocidad de reacción. Estos catalizadores pueden programarse para vincularse a las características geométricas y electrostáticas del estado de transición de forma que la ruta de reacción pueda controlarse mediante la neutralización de las cargas desfavorables, superando las barreras entrópicas, y dictando las características estereoelectrónicas de la reacción. Por este medio se han catalizado reacciones que de otra manera estarían muy desfavorecidas (Janda *et al.* 1997). Además, en muchos casos, se han fabricado catalizadores para reacciones para las que no se conocen enzimas naturales o diseñadas por el hombre.

El éxito de cualquier sistema químico combinatorio en la obtención de una función concreta depende del tamaño de la biblioteca y de la capacidad de acceso de sus miembros. Muy frecuentemente, los anticuerpos que se preparan en un animal contra un hapteno que imita el estado de transición de una reacción se criban en primer lugar para la unión al hapteno y a continuación se criban de nuevo para la actividad catalítica. Un método mejorado permite la

selección directa para la catálisis a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos, uniendo por tanto la química y la replicación.

5 Se puede crear una biblioteca de fragmentos de anticuerpos sobre la superficie de virus de fagos filamentosos añadiendo genes de anticuerpos aleatorizados al gen que codifica la proteína de revestimiento del fago. Cada fago expresa y presenta a continuación múltiples copias de un único fragmento de anticuerpo sobre su superficie. Como cada fago posee tanto el fragmento de anticuerpo expresado en su superficie como el ADN que codifica este fragmento, el fragmento de anticuerpo que se une a una diana puede identificarse amplificando el ADN asociado.

10 Los inmunológicos utilizan como antígenos materiales que tienen tan poca reactividad química como sea posible. Este es casi siempre el caso si se desea en última instancia que el anticuerpo interactúe con las estructuras naturales. En inmunización reactiva el concepto es justo el opuesto. Se inmuniza con compuestos que son muy reactivos de manera que, tras su unión a la molécula de anticuerpo durante el proceso de inducción, sobreviene una reacción química. Posteriormente, esta misma reacción química se convierte en parte del mecanismo de
15 acontecimiento catalítico. En un determinado sentido, se inmuniza con una reacción química más bien que con una sustancia *per se*. Los inmunógenos reactivos se pueden considerar como análogos de los inhibidores basados en el mecanismo que los enzimólogos utilizan excepto que se utilizan de manera inversa ya que, en lugar de inhibir un mecanismo, inducen un mecanismo.

20 Los anticuerpos catalíticos fabricados por el hombre tienen considerable potencial comercial en muchas aplicaciones diferentes. Los productos basados en anticuerpos catalíticos se han utilizado satisfactoriamente en experimentos prototipo de aplicaciones terapéuticas, tales como la activación de profármacos y la inactivación de cocaína, y en aplicaciones no terapéuticas, tales como biosensores y síntesis orgánica.

25 Los anticuerpos catalíticos son teóricamente más atractivos que los anticuerpos no catalíticos como agentes terapéuticos ya que, siendo catalíticos, se pueden utilizar en dosis menores, y debido también a que sus efectos son inusualmente irreversibles (por ejemplo, escisión del enlace peptídico en lugar de unión). En tratamiento, los anticuerpos catalíticos purificados podrían administrarse directamente a un paciente, o alternativamente, la respuesta de anticuerpos catalíticos del propio paciente podría estimularse mediante inmunización con un hapteno
30 adecuado. Los anticuerpos catalíticos también podrían utilizarse como herramientas de diagnóstico clínico o como catalizadores regioselectivos o estereoselectivos en la síntesis de productos químicos refinados.

I. Mutación de los bucles de Fn3 e injerto de los bucles del Ab sobre Fn3

35 Una estructura ideal para un injerto de la CDR es muy soluble y estable. Es suficientemente pequeña para el análisis estructural, pero lo suficientemente grande para acomodar múltiples CDR para conseguir una estrecha unión y/o una elevada especificidad.

40 Se ha desarrollado una novedosa estrategia para generar un sistema Ab artificial sobre el marco de una proteína sin Ab. Una ventaja de esta solución sobre la minimización de una estructura de Ab es que se puede evitar heredar las propiedades indeseadas de los Ab. Se usó el dominio de tipo III de la fibronectina (Fn3) como la estructura principal. La fibronectina es una proteína grande que juega papeles esenciales en la formación de la matriz extracelular y las interacciones intercelulares; consiste en muchas repeticiones de tres tipos (I, II y III) de dominios pequeños (Baron *et al.*, 1991). La propia Fn3 es el paradigma de una gran subfamilia (familia Fn3 o familia de Ig de tipo s) de la
45 superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). La familia Fn3 incluye moléculas de adhesión celular, hormonas de la superficie celular y receptores de citoquinas, chaperoninas, y dominios de unión a hidratos de carbono (para las revisiones, véanse Bork y Doolittle, 1992; Jones, 1993; Bork *et al.*, 1994; Campbell y Spitzfaden, 1994; Harpez y Chothia, 1994).

50 Recientemente, los estudios cristalográficos han revelado que la estructura de los dominios de unión a ADN del factor de transcripción NF- κ B está también estrechamente relacionada con el pliegue de Fn3 (Ghosh *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1995). Todas estas proteínas están implicadas en el reconocimiento molecular específico y, en la mayoría de los casos, los sitios de unión a ligando están formados por bucles superficiales, lo que sugiere que la estructura de Fn3 es un excelente marco para construir proteínas de unión específicas. La estructura 3D de Fn3 se ha determinado mediante RMN (Main *et al.*, 1992) y mediante cristalografía de rayos X (Leahy *et al.*, 1992; Dickinson
55 *et al.*, 1994). La estructura se describe mejor como un β -sándwich similar al del dominio VH de Ab excepto que Fn3 tiene siete hebras β en vez de nueve (Fig. 1). Existen tres bucles en cada extremo de Fn3; las posiciones de los bucles BC, DE y FG corresponden aproximadamente a las de CDR1, 2 y 3 del dominio VH, respectivamente (Fig. 1 C, D).

60 Fn3 es pequeño (~ 95 restos), monomérico, soluble y estable. Es uno de los pocos miembros de IgSF que no tienen enlaces disulfuro; VH tiene un enlace disulfuro interhebra (Fig. 1 A) y tiene una estabilidad marginal en condiciones reductoras. Fn3 se ha expresado en *E. coli* (Aukhil *et al.*, 1993). Además, 17 dominios de Fn3 están presentes solamente en la fibronectina humana, lo que proporciona una importante información sobre los restos conservados
65 que frecuentemente son importantes para la estabilidad y el plegamiento (para la alineación de secuencias, véase Main *et al.*, 1992 y Dickinson *et al.*, 1994). A partir del análisis de las secuencias, se observan grandes variaciones

en los bucles BC y FG, lo que sugiere que los bucles no son cruciales para la estabilidad. Los estudios de RMN han revelado que el bucle FG es muy flexible; se ha implicado la flexibilidad en la unión específica del 10^o Fn3 a la integrina $\alpha_5\beta_1$ mediante el motivo Arg-Gly-Asp (RGD). En la en la estructura cristalina del complejo de la hormona del crecimiento humana (de Vos *et al.*, 1992), el segundo dominio Fn3 del receptor interactúa con la hormona mediante los bucles FG y BC, lo que sugiere que es factible construir un sitio de unión utilizando los dos bucles.

El décimo módulo de tipo III de la fibronectina tiene un pliegue similar al de los dominios de la inmunoglobulina, con siete hebras β formando dos láminas β antiparalelas, que se empaquetan entre sí (Main *et al.*, 1992). La estructura del módulo de tipo II consiste en siete hebras β , que forman un sándwich de dos láminas β antiparalelas, conteniendo una tres hebras (ABE) y la otra cuatro hebras (C'CFG) (Williams *et al.*, 1988). Las láminas β de triple hebra consisten en los restos Glu-9-Thr-14 (A), Ser-17-Asp-23 (B), y Thr-56-Ser-60 (E). La mayoría de los restos conservados contribuyen al núcleo hidrófobo, donde los restos hidrófobos invariantes Trp-22 y Try-6S se dirigen hacia los extremos N y extremos C del núcleo, respectivamente. Las hebras β son mucho menos flexibles y parecen proporcionar un marco rígido tras el cual construyen los bucles flexibles funcionales. La topología es similar a la de los dominios de la inmunoglobulina C.

Construcción génica y mutagénesis

Se diseñó un gen sintético para el décimo Fn3 de la fibronectina humana (Fig. 2) que incluye sitios de restricción convenientes para facilitar la mutagénesis y utiliza codones específicos para la expresión de la proteína a alto nivel (Gribskov *et al.*, 1984).

El gen se ensambló como sigue: (1) la secuencia del gen se dividió en cinco partes con límites en los sitios de restricción previstos (Fig.); (2) para cada parte, se sintetizó una pareja de oligonucleótidos que codifican hebras opuestas y tienen solapamientos complementarios de ~ 15 bases; (3) los dos oligonucleótidos se hibridaron y se llenaron las regiones monocatenaria utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa; (4) se clonaron los oligonucleótidos bicatenarios en el vector pET3a (Novagen) utilizando sitios de la enzima de restricción en los extremos del fragmento y se confirmó su secuencia mediante un secuenciador de ADN de Applied Biosystems utilizando el protocolo de terminación dideoxi proporcionado por el fabricante, (5) se repitieron las etapas 2-4 para obtener el gen completo (plásmido pAS25) (Fig. 7).

Aunque el presente método tarda más tiempo en ensamblar un gen que el del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sandhu *et al.*, 1992), no se producen mutaciones en el gen. Las mutaciones se habrían introducido probablemente debido a la replicación de baja fidelidad por la polimerasa Taq y habrían requerido una edición del gen con pérdida de tiempo. El gen se clonó también en el vector pET15b (Novagen) (pEW1). Ambos vectores expresaron el gen Fn3 bajo el control del promotor del bacteriófago T7 (Studler *et al.* 1990); pAS25 expreso solamente la proteína Fn3 de 96 restos, mientras que pEW1 expresó Fn3 como una proteína de fusión con el péptido poli-histidina (His*tag). Se llevaron a cabo manipulaciones del ADN recombinante de acuerdo con Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989), salvo que se indique de otra forma.

Se introdujeron mutaciones en el gen Fn3 utilizando técnicas de mutagénesis de casete o técnicas de mutagénesis de oligonucleótidos dirigidas al sitio (Deng y Nickoloff, 1992). Se llevó a cabo la mutagénesis de casete utilizando el mismo protocolo para la construcción de genes descrito anteriormente; se clonó un fragmento de ADN bicatenario que codificaba una nueva secuencia en un vector de expresión (pAS25 y/o pEW1). Pueden realizarse muchas mutaciones combinando una hebra recién sintetizada (mutaciones codificantes) y un oligonucleótido utilizado para la síntesis de genes. Los genes resultantes se secuenciaron para confirmar que se introdujeron las mutaciones diseñadas, y no otras mutaciones, mediante las reacciones de mutagénesis.

Diseño y síntesis de mutantes Fn3 con anticuerpos dirigidos contra las CDR

Se identificaron dos bucles candidatos (FG y BC) para el injerto. Se examinaron anticuerpos con estructuras cristalinas conocidas para identificar candidatos para las fuentes de bucles a injertar en Fn3. Se seleccionó el anticuerpo D1.3 contra la lisozima de clara de huevo de gallina (HEL) (Bhat *et al.*, 1994) como la fuente del bucle de una CDR. Los motivos para esta elección fueron: (1) están disponibles estructuras cristalinas de alta resolución de los estados libres y complejados (Fig. 4 A; Bhat *et al.*, 1994), (2) están disponibles los datos termodinámicos de la unión (Tello *et al.*, 1993), (3) se ha utilizado D1.3 como paradigma en el análisis estructural del Ab y el diseño mediante ingeniería del Ab (Verhoeyen *et al.*, 1988; McCafferty *et al.*, 1990), (4) los experimentos de mutagénesis dirigida al sitio han mostrado que la CDR3 de la cadena pesada (VH-CDR3) realiza una contribución a la afinidad mayor que el resto de CDR (Hawkins *et al.*, 1993), y (5) el ensayo de la unión se lleva a cabo fácilmente. El objetivo de este ensayo era injertar VH-CDR3 de D1.3 sobre la estructura principal de Fn3 sin pérdida significativa de estabilidad.

Un análisis de la estructura de D 1.3 (Fig. 4) reveló que solo los restos 99-102 ("RDYR") (SEC ID N^o:120) entran en contacto directo con la lisozima de clara de huevo de gallina (HEL) (Fig. 4 B), aunque VH-CDR3 se define como más largo (Bhat *et al.*, 1994). Debe señalarse que la mitad del extremo C de VH-CDR3 (restos 101-104) entra en contacto significativo con el dominio VL (Fig. 4 B). También resulta evidente que D1.3 VH-CDR3 (Fig. 4 C) tiene una

vuelta más corta entre las hebras F y G que el bucle FG de Fn3 (Fig. 4 D). Por tanto, se diseñaron secuencias mutantes utilizando RDYR (99-102) (SEC ID N°:120) de D1.3 como el núcleo y se establecieron diferentes límites y longitudes de bucles (Tabla 1). Bucles más cortos pueden imitar mejor la conformación de D1.3 CDR3, dando como resultado por tanto una mayor afinidad, pero también pueden reducir significativamente la estabilidad al eliminar las interacciones naturales de Fn3.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de D1.3 VH CDR3, Bucles VH8 CDR3 y bucle Fn3 FG y lista de mutantes planificados.

D1.3	96 100 105 • • • <u>ARERDYRLDYWGQG</u>	(SEC ID N°:1)
VH8	<u>ARGAVVSY YAMDYWGQG</u>	(SEC ID N°:2)
Fn3	75 80 85 • • • <u>YAVTGRGDSPASSKPI</u>	(SEC ID N°:3)
Mutante	Secuencia	
D1.3-1	Y A E R D Y R L D Y ---- P I	(SEC ID N°:4)
D 1.3-2	Y A V R D Y R L D Y ---- P I	(SEC ID N°:5)
D 1.3-3	Y A V R D Y R L D Y A S S K P I	(SEC ID N°:6)
D1.3-4	Y A V R D Y R L D Y --- K P I	(SEC ID N°:7)
D1.3-5	Y A V R D Y R ----- S K P I	(SEC ID N°:8)
D 1.3-6	Y A V T R D Y R L -- S S K P I	(SEC ID N°:9)
D1.3-7	Y A V T E R D Y R L - S S K P I	(SEC ID N°:10)
VH8-1	Y A V A V V S Y Y A M D Y - P I	(SEC ID N°:11)
Mutante	Secuencia	
VH8-2	Y A V T A V V S Y Y A S S K P I	(SEC ID N°:12)
Los subrayados indican restos en las hebras β. Los caracteres en negrita indican restos sustituidos.		

Además, se seleccionó un único dominio VH dirigido contra HEL denominado VH8 (Ward *et al.*, 1989) como plantilla. Se seleccionó VH8 mediante cribado de una biblioteca y, a pesar de la ausencia del dominio VL, VH8 tenía una afinidad por HEL de 27 nM, debido probablemente a su VH-CDR3 más larga (Tabla 1). Por tanto, su VH-CDR3 se injertó sobre Fn3. Bucles más largos pueden ser ventajosos en el marco de Fn3 ya que pueden proporcionar mayor afinidad y también están cercanos a la longitud del bucle del Fn3 natural. La estructura 3D de VH8 no era conocida y de esta manera la secuencia de VH8 CDR3 se alineó con la de D1.3 VH-CDR3; se diseñaron dos bucles (Tabla 1).

Construcción y producción de mutantes

Se llevaron a cabo experimentos de mutagénesis dirigida a sitio para obtener las secuencias diseñadas. Se obtuvieron dos mutantes Fn3s, D1.3-1 y D1.3-4 (Tabla 1) y ambos se expresaron como proteínas de fusión His*tag solubles. D1.3-4 se purificó y la porción His*tag se eliminó mediante escisión de trombina. D1.3-4 es soluble hasta al menos 1 mM a pH 7,2. No se ha observado agregación de la proteína durante la preparación y adquisición de datos mediante RMN de la muestra.

Expresión y purificación de proteínas

Se transformaron *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) con un vector de expresión (pAS25, pEW1 y sus derivados) que contienen un gen natural o un gen mutante. Las células se hicieron crecer en medio mínimo M9 y se suplementó el medio M9 con Bactotrypton (Difco) que contenía ampicilina (200 µg/ml). Para el marcado isotópico, ¹⁵N NH₄Cl y/o ¹³C glucosa sustituyó a los componentes no marcados. 500 ml de medio en un matraz de 2 litros provisto de deflectores se inocularon con 10 ml de cultivo durante la noche y se agitaron a 37 °C. Se añadió isopropiltio-β-galactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM para iniciar la expresión de la proteína cuando la DO (600 nm) alcanza el valor de la unidad. Se recogieron las células mediante centrifugación 3 horas después de la adición de IPTG y se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta que se utilizaron.

Fn3 sin His*tag se purificó como sigue. Se suspendieron las células en 5 ml/(g de célula) de Tris (50 mM, pH 7,6) que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 1 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mM). Se añadió HEL a una concentración final de 0,5 mg/ml. Tras incubar la solución durante 30 minutos a 37 °C, se sometió tres veces a ultrasonido durante 30 segundos en hielo. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación. Se añadió sulfato de amonio a la solución y el precipitado se recuperó mediante centrifugación. El aglomerado se disolvió en 5-

10 ml de acetato de sodio (50 mM, pH 4,6) y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación. Se aplicó la solución a una columna Sephacryl S100HR (Pharmacia) equilibrada en el tampón de acetato de sodio. A continuación se aplicaron las fracciones que contenían Fn3 a una columna ResourceS (Pharmacia) equilibrada en acetato de sodio (50 mM, pH 4,6) y se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0-0,5 M). El protocolo se puede ajustar para purificar proteínas mutantes con diferentes propiedades de carga superficial.

Fn3 con His•tag se purificó como sigue. La fracción soluble se preparó como se ha descrito anteriormente, excepto que el tampón fosfato de sodio (50 mM, pH 7,6) que contenía cloruro de sodio (100 mM) sustituyó el tampón Tris. La solución se aplicó a una columna quelante Hi-Trap (Pharmacia) precargada con níquel y equilibrada con tampón fosfato. Tras lavar la columna con el tampón, se eluyó His•tag-Fn3 con el tampón fosfato que contenía EDTA 50 mM. Las fracciones que contenían His•tag-Fn3 se combinaron y se aplicaron a una columna Sephacryl S100-HR, dando como resultado una proteína muy pura. La porción His•tag se eliminó mediante escisión tratando la proteína de fusión con trombina utilizando el protocolo suministrado por Novagen. Se separó Fn3 del péptido His•tag y de la trombina mediante una columna ResourceS utilizando el protocolo anterior.

Las proteínas naturales y dos proteínas mutantes examinadas hasta ahora se expresaron como proteínas solubles. En el caso de que un mutante se exprese como cuerpo de inclusión (agregado insoluble), se examina en primer lugar si puede expresarse como proteína soluble a temperatura más baja (por ejemplo, 25-30 °C). Si esto no es posible, los cuerpos de inclusión se recogen mediante centrifugación a baja velocidad tras la lisis celular tal como se ha descrito anteriormente. El aglomerado se lava con tampón, se sonica y se centrifuga. Los cuerpos de inclusión se solubilizan en tampón fosfato (50 mM, pH 7,6) que contiene cloruro de guanidinio (GdnCl, 6 M) y se cargarán en una columna quelante Hi-Trap. La proteína se eluye con el tampón que contiene GdnCl y EDTA 50 mM.

Conformación del Fn3 mutante, D1.3-4

Los espectros de RMN ¹H de la proteína de fusión His•tag D1.3-4 son muy parecidos al de la proteína natural, lo que sugiere que el mutante se plegó en una conformación similar a la de la proteína natural. El espectro de D1.3-4 tras la eliminación del péptido His•tag mostró una dispersión espectral grande. Una dispersión grande de los protones de amida (7-9,5 ppm) y un número grande de protones (5,0-6,5 ppm) C^α campo abajo son característicos de la proteína de una lámina β (Wüthrich, 1986).

El espectro 2D NOESY de D1.3-4 proporcionó una evidencia adicional de una conformación preservada. La región en el espectro mostró interacciones entre los protones de metilo campo arriba (< 0,5 ppm) y los protones de metilmetileno. Las resonancias de Val72 y metilo se separaron bien en el espectro natural (-0,07 y 0,37 ppm; (Baron *et al.*, 1992)). Las resonancias que corresponden a los protones de dos metilos están presentes en el espectro de D1.3-4 (-0,07 y 0,44 ppm). El pico cruzado entre estas dos resonancias y otros picos cruzados conservados indican que las dos resonancias del espectro de D1.3-4 son muy similares a las de Val72 y las de otros protones de metilo que están en un entorno casi idéntico al de Fn3 natural. Diferencias poco importantes entre los dos espectros se deben presumiblemente a pequeñas perturbaciones estructurales debidas a mutaciones. Val72 está en la hebra F, donde forma parte del núcleo hidrófobo central de Fn3 (Main *et al.*, 1992). Tiene solamente cuatro restos alejados de los restos mutados del bucle FG (Tabla 1). Los resultados son notables porque, aunque existen 7 mutaciones y 3 deleciones en el bucle (más de un 10 % de los restos totales; Fig. 12, Tabla 2), D1.3-4 retiene una estructura 3D virtualmente idéntica a la del tipo natural (excepto para el bucle mutado). Por tanto, los resultados proporcionan un fuerte respaldo de que el bucle FG no contribuye significativamente al plegado y a la estabilidad de la molécula de Fn3 y, por tanto, el bucle FG puede mutarse ampliamente.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia
FN1F	CGGGATCCCATATGCAGGTTTCTGATGTTCCGCGTGACC TGGAAGTTGTTGCTGCGACC (SEC ID N°:13)
FN1R	TAACTGCAGGAGCATCCCAGCTGATCAGCAGGCTAGTC GGGGTTCGCAGCAACAAC (SEC ID N°:14)
FN2F	CTCCTGCAGTTACCGTGCGTTATTACCGTATCACGTACG GTGAAACCGGTG (SEQ ID NO:15)
FN2R	GTGAATTCCTGAACCGGGGAGTTACCACCGGTTTCACC G (SEC ID N°:16)

Nombre	Secuencia
FN3F	<u>AGGAATTC</u>ACTGTACCTGGTTCCAAGTCTACTGCTACCA TCAGCGG (SEC ID N°:17)
FN3R	GTATAGTCGACACCCGGTTTCAGGCCGCTGATGGTAGC (SEC ID N°:18)
FN4F	CGGGTGTGCGACTATACCATCACTGTATACGCT (SEC ID N°:19)
FN4R	CGGGATCC<u>GAGCTC</u>GCTGGGCTGTCACCACGGCCAGTA ACAGCGTATACAGTGAT (SEC ID N°:20)
FN5F	CAGCGAGCTCCAAGCCAATCTCGATTA ACTACCGT (SEC ID N°:21)
FN5R	CCGGGATCCTCGAGTTACTAGGTACGGTAGTTAATCGA (SEC ID N°:22)
FN5R'	CGGGATCCACGCGTGCCACCGGTACGGTAGTTAATCGA (SEC ID N°:23)
gen 3F	CGGGATCCACGCGTCCATTCTGTTGTGAATATCAAGGCC AATCG (SEC ID N°:24)
gen 3R	CCGGAAGCTTTAAGACTCCTTATTACGCAGTATGTTAGC (SEC ID N°:25)
38TAABgIII	CTGTTACTGGCCGTGAGATCTAACCAGCGAGCTCCA (SEC ID N°:26)
BC3	GATCAGCTGGGATGCTCCTNNKNNKNNKNNKNNKTATT ACCGTATCACGTA (SEC ID N°:27)
FG2	TGTATACGCTGTTACTGGCNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNK NKTCCAAGCCAATCTCGAT (SEC ID N°:28)
FG3	CTGTATACGCTGTTACTGGCNNKNNKNNKNNKCCAGCG AGCTCCAAG (SEC ID N°:29)
FG4	CATCACTGTATACGCTGTTACTNNKNNKNNKNNKNNKNNKT CCAAGCCAATCTC (SEC ID N°:30)

Los sitios de la enzima de restricción están subrayados. N y K denotan una mezcla equimolar de A, T, G y C y de G y T, respectivamente.

Estructura y medidas de estabilidad

5 Se analizaron las estructuras de los Ab utilizando métodos cuantitativos (*por ejemplo*, DSSP (Kabsch y Sander, 1983) y PDBfit (D. McRee, The Scripps Research Institute)) así como las gráficas de ordenador (*por ejemplo*, Quanta (Molecular Simulations) y What if (G. Vriend, European Molecular Biology Laboratory)) para superponer las estructuras hebra-bucle-hebra de los Ab y Fn3.

10 Se determinó la estabilidad de los monocuerpos midiendo las reacciones de desplegamiento inducidas por la temperatura y la desnaturalización química (Pace *et al.*, 1989). Se midió la reacción de desplegamiento inducida por temperatura utilizando un polarímetro con dicroísmo circular (CD). Se registró la elipticidad a 222 y 215 nm a medida que se aumentaba lentamente la temperatura de la muestra. Se utilizaron concentraciones de muestra entre 10 y 50 μ M. Tras el desplegamiento, se estableció el valor inicial, la temperatura se disminuyó para examinar la reversibilidad de la reacción de desplegamiento. Se determinó la energía libre del desplegamiento ajustando los datos a la ecuación de la transición en dos estados (Becktel y Schellman, 1987; Pace *et al.*, 1989). Se llevó a cabo el ajuste de mínimos cuadrados no lineal utilizando el programa Igor (WaveMetrics) en un ordenador Macintosh.

20 Se estudiaron la estructura y la estabilidad de dos mutantes Fn3s seleccionados; el primer mutante era D1.3-4 (Tabla 2) y el segundo era un mutante denominado AS40 que contiene cuatro mutaciones en el bucle BC ($A^{26}V^{27}T^{28}V^{29} \rightarrow TQRQ$). AS40 se seleccionó aleatoriamente de la biblioteca de bucles BC que se ha descrito anteriormente. Ambos mutantes se expresaron como proteínas solubles en *E. coli* y se concentraron al menos hasta 1 mM, permitiendo los estudios de RMN.

25 El punto medio de la desnaturalización térmica de ambos mutantes era aproximadamente de 69 °C, en comparación con aproximadamente 79 °C para la proteína natural. Los resultados indican que las mutaciones extensas en los dos

bucles superficies no disminuyen drásticamente la estabilidad de Fn3, y de esta manera demostraron la factibilidad de introducir un gran número de mutaciones en ambos bucles.

Se determinó también la estabilidad mediante cloruro de guanidinio (GdnCl) y reacciones de desplegamiento inducidas por urea. Se registraron las curvas de desplegamiento preliminares utilizando un fluorómetro equipado con una jeringuilla impulsada con motor; Se añadieron GdnCl o urea de forma continua a la solución de proteínas en la cubeta. Basándose en las curvas de desplegamiento preliminares, se prepararon muestras separadas que contenían concentraciones variables de desnaturalizante y se midieron la fluorescencia (excitación a 290 nm, emisión a 300-400 nm) o el CD (elipticidad a 222 y 215 nm) una vez que las muestras se equilibraron a la temperatura de medida durante al menos una hora. La curva se ajustó por el método de mínimos cuadrados a la ecuación del modelo en dos estados (Santorio y Bolen, 1988; Koide *et al.*, 1993). Se compensó el cambio en la concentración de proteínas según necesidad.

Una vez que se estableció la reversibilidad en la reacción de desplegamiento térmico, se midió la reacción de desplegamiento mediante un calorímetro de barrido diferencial Microcal MC-2 (DSC). La celda (~ 1,3 ml) se cargará con una solución de FnAb (0,1 - 1 mM) y se registrará el ΔC_p ($= \Delta H/\Delta T$) a medida que se aumenta la temperatura lentamente. T_m (el punto medio del desplegamiento), el ΔH del desplegamiento y el ΔG del desplegamiento se determinaron ajustando la curva de transición (Privalov y Potekhin, 1986) con el software Origin proporcionado por Microcal.

Desplegamiento térmico

Se llevó a cabo un experimento de desplegamiento inducido por temperatura sobre Fn3 utilizando espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para vigilar los cambios en la estructura secundaria. El espectro CD de la Fn3 natural muestra una señal máxima próxima a 222 nm (Fig. 3A), consistente con la estructura β predominante de Fn3 (Percezel *et al.*, 1992). Se observó una transición de desplegamiento cooperativo a 80-90 °C, indicando claramente una elevada estabilidad de Fn3 (Fig. 3B). La energía libre del desplegamiento no se pudo determinar debido a la carencia de un valor inicial posterior a la transición. El resultado es coherente con la elevada estabilidad del primer dominio Fn3 de la fibronectina humana (Litvinovich *et al.*, 1992), indicando de esta manera que los dominios Fn3 son, en general, muy estables.

Ensayos de unión

Se caracterizaron cuantitativamente las reacciones de unión de los monocuerpos utilizando un calorímetro de valoración isotérmica (ITC) y espectroscopia de fluorescencia.

Se midió la variación de entalpía (ΔH) de la unión mediante un equipo Microcal Omega ITC (Wiseman *et al.*, 1989). La celda de muestra (~ 1,3 ml) se llenó con una solución de Monobody ($\leq 100 \mu M$, se cambió de acuerdo con K_d), y la celda de referencia se llenó con agua destilada; el sistema se equilibró a una temperatura dada hasta que se obtuvo un valor inicial estable; se inyectaron 5-20 μl de solución ligando (s 2 mM) mediante una jeringuilla impulsada con motor durante un tiempo corto (20 s) seguido por un retraso de equilibrio (4 minutos); la inyección se repitió, y se midió la generación/absorción de calor para cada inyección. A partir del cambio en el cambio de calor observado en función de la concentración del ligando, se determinaron los valores de ΔH y K_d (Wiseman *et al.*, 1989). Los valores de ΔG y ΔS de la reacción de unión se dedujeron a partir de los dos parámetros medidos directamente. Se examinó la desviación de la curva teórica para evaluar la unión no específica (sitios múltiples). Se llevaron a cabo también experimentos colocando un ligando en la celda y valorando con un FnAb. Debe hacerse hincapié en que solamente ITC proporciona una medida directa de ΔH , posibilitando de esta forma la evaluación de las contribuciones entálpicas y entrópicas a la energía de unión. Se usó ITC satisfactoriamente para vigilar la reacción de unión del D1.3 Ab (Tello *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1994).

Se vigiló la fluorescencia intrínseca para medir las reacciones de unión con K_d en el subintervalo μM , en el que la determinación de K_d mediante ITC es difícil. Se vigiló la fluorescencia Trp (excitación a ~ 290 nm, emisión a 300-350 nm) y la fluorescencia Tyr (excitación a ~ 260 nm, emisión a - 303 nm) a medida que se valoró la solución del mutante Fn3 ($\leq 10 \mu M$) con la solución ligando ($\leq 100 \mu M$). Se determinó K_d de la reacción mediante el ajuste de mínimos cuadrados no lineal de la ecuación de unión bimolecular. Se examinó la presencia de sitios de unión secundarios utilizando el análisis Scatchard. En todos los ensayos de unión, se realizaron experimentos control utilizando Fn3 natural (o monocuerpos sin relacionar) en lugar de los monocuerpos de interés.

II. Producción de mutantes Fn3 con monocuerpos de elevada afinidad y especificidad

Se llevó a cabo el cribado de la biblioteca para seleccionar monocuerpos que se unen a ligandos específicos. Esto es complementario de la solución de modelización descrita anteriormente. La ventaja del cribado combinatorio es que se puede producir y cribar fácilmente un gran número de variantes ($\geq 10^8$), lo que no es factible con las soluciones de mutagénesis específica ("diseño lógico"). La técnica de expresión de fagos (Smith, 1985; O'Neil y Hoess, 1995) se utilizó para efectuar los procesos de cribado. Fn3 se fusionó para una proteína de revestimiento de fagos (pIII) y se expresó sobre la superficie de fagos filamentosos. Estos fagos hospedan un genoma de ADN monocatenario que contiene el gen que codifica la proteína de fusión Fn3. Se aleatorizó la secuencia de

aminoácidos de regiones definidas de Fn3 utilizando una secuencia de nucleótidos degenerada, construyendo de esta forma una biblioteca. Los mutantes Fn3 que expresan fagos con las capacidades de unión deseadas se seleccionaron *in vitro*, se recuperaron y amplificaron. Se puede identificar fácilmente la secuencia de aminoácidos de un clon seleccionado secuenciando el gen Fn3 del fago seleccionado. Se siguieron los protocolos de Smith (Smith y Scott, 1993) con modificaciones menores.

El objetivo era producir monocuerpos que tuvieran una elevada afinidad por ligandos de proteínas pequeñas. HEL y el dominio B1 de la proteína G estafilocócica (denominado a partir de ahora en el presente documento como proteína G) se utilizaron como ligandos. La proteína G es pequeña (56 aminoácidos) y muy estable (Minor y Kim, 1994; Smith *et al.*, 1994). Su estructura se determinó mediante espectroscopia de RMN (Gronenborn *et al.*, 1991), y resultó ser una hélice empaquetada contra a una lámina β de cuatro hebras. Los complejos de FnAb-proteína G (~150 restos) resultantes es uno de los complejos proteína-proteína más pequeños producidos hasta la fecha, bien comprendido en el intervalo de los métodos de RMN directos. El tamaño pequeño, la elevada estabilidad y solubilidad de ambos componentes y la capacidad de marcar cada uno de ellos con isótopos estables (^{13}C y ^{15}N ; véase más adelante para la proteína G) hace de los complejos un sistema modelo ideal para los estudios de RMN sobre las interacciones entre proteínas.

La sustitución satisfactoria del bucle de Fn3 (el mutante D1.3-4) demuestra que al menos diez restos pueden estar mutados sin pérdida del pliegue global. Basándose en esto, se construyó en primer lugar una biblioteca en la que se aleatorizaron solamente los restos del bucle FG. Una vez obtenidos los resultados de los experimentos de sustitución de bucle en el bucle BC, se extendieron sitios de mutación hasta incluir el bucle BC y otros sitios.

Construcción del sistema de expresión de fagos de Fn3

Se ha construido un vector pASM1 de expresión basado en el fago M13 como sigue: un oligonucleótido que codifica el péptido de señalización de OmpT se clonó en el extremo 5' del gen Fn3; se preparó un fragmento del gen que codifica el dominio del extremo C de M 13 pIII a partir del gen III del gen de M 13 mp18 utilizando la PCR (Corey *et al.*, 1993) y el fragmento se insertó en el extremo 3' del gen OmpT-Fn3; se insertó una secuencia separadora entre Fn3 y pIII. El fragmento resultante (OmpT-Fn3-pIII) se clonó en el sitio de clonación múltiple de M13 mp18, donde el gen de fusión está bajo el control del promotor lac. Este sistema producirá la proteína de fusión Fn3-pIII así como la proteína pIII natural. Se espera que la expresión simultánea de pIII natural reduzca el número de proteínas pIII de fusión, aumentando por tanto la infectividad del fago (Corey *et al.*, 1993) (cinco copias de pIII están presentes en las partículas del fago). Además, un número más pequeño de proteínas pIII de fusión puede ser ventajoso en la selección de proteínas de unión estrechas, porque el efecto quelante debido a los múltiples sitios de unión debe ser más pequeño que con las cinco copias de fusión pIII (Bass *et al.*, 1990). Este sistema ha expresado satisfactoriamente la serina proteasa tripsina (Corey *et al.*, 1993). Los fagos se produjeron y purificaron utilizando *E. coli* K91kan (Smith y Scott, 1993) de acuerdo con un método normalizado (Sambrook *et al.*, 1989) excepto que las partículas del fago se purificaron mediante una segunda precipitación con polietilenglicol y precipitación ácida.

Se ha confirmado la expresión satisfactoria de Fn3 sobre los fagos de fusión mediante ELISA utilizando un Ab contra fibronectina (Sigma), indicando claramente que es factible construir bibliotecas utilizando este sistema.

Se puede usar también un sistema alternativo que utiliza fUSE5 (Parmley y Smith, 1988). El gen Fn3 se inserta en fUSE5 utilizando los sitios de restricción Sfil introducidos en los extremos 5' y 3' del gen Fn3 mediante la PCR. Este sistema expresa solamente la proteína pIII de fusión (hasta cinco copias) sobre la superficie de un fago. Los fagos se producen y se purifican como se describe (Smith y Scott, 1993). Este sistema se ha utilizado para expresar muchas proteínas y es sólido. La ventaja de fUSE5 es su baja toxicidad. Esto se debe al bajo número de copias de la forma de replicación (RF) en el hospedador, que a su vez dificulta preparar una suficiente de RF cantidad para la construcción de una biblioteca (Smith y Scott, 1993).

Construcción de bibliotecas

La primera biblioteca se construyó para el dominio Fn3 presentado sobre la superficie del fago M13 en el que se aleatorizaron siete restos (77-83) del bucle FG (Fig. 4D). Se consiguió la aleatorización mediante el uso de un oligonucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos degenerada. Se preparó un nucleótido bicatenario mediante el mismo protocolo que para la síntesis de genes (véase anteriormente) excepto que una hebra tenía una secuencia (NNK)₆(NNG) en los sitios de mutación, donde N corresponde a una mezcla equimolar de A, T, G y C y K corresponden a una mezcla equimolar de G y T. Se requirió el codón (NNG) del resto 83 para conservar el sitio de restricción SacI (Fig. 2). El codón (NNK) codifica los 20 aminoácidos, mientras que el codón NNG codifica 14. Por tanto, esta biblioteca contenía ~ 10⁹ secuencias independientes. La biblioteca se construyó uniendo el nucleótido bicatenario al vector de fagos natural, pASM1, y transfectando *E. coli* XL1 blue (Stratagene) mediante electroporación. XL1 blue tiene el fenotipo lacI^q y, por tanto, suprime la expresión de la proteína de fusión Fn3-pIII en ausencia de los inductores de lac. La biblioteca inicial se propagó de esta manera, para evitar la selección frente a los clones Fn3-pIII tóxicos. Se prepararon fagos que expresaban la proteína de fusión Fn3-pIII aleatorizada propagando fagos con K91kan como hospedador. K91kan no suprime la producción de la proteína de fusión, porque no tiene lacI^q. Se generó también otra biblioteca en la que se aleatorizó el bucle BC (restos 26-20).

Selección de monocuerpos expresados

Se llevó a cabo el cribado de las bibliotecas de fagos Fn3 utilizando el protocolo de la técnica de selección por afinidad de *biopanning* (Smith y Scott, 1993); un ligando se biotinila y se la fuerte interacción biotina-estreptavidina se utilizó para inmovilizar el ligando sobre una placa revestida con estreptavidina. Los experimentos se llevaron a cambio a temperatura ambiente (- 22 °C). Para la recuperación inicial de fagos de una biblioteca, se inmovilizaron 10 µg de un ligando biotinilado en una placa de poliestireno revestida con estreptavidina (35 mm, Falcon 1008) y a continuación se añadió una solución de fagos (que contenía ~ 10¹⁰ ufp (unidad formadora de placas)). Tras lavar la placa con un tampón adecuado (normalmente TBST, Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), NaCl (150 mM) y Tween 20 (0,5 %)), los fagos unidos se eluyeron mediante una o combinaciones de las siguientes condiciones: pH bajo, una adición de un ligando libre, urea (hasta 6 M) y, en el caso de monocuerpos dirigidos contra proteína G, escisión del enlazador proteína G-biotina mediante trombina. Los fagos recuperados se amplificaron utilizando el protocolo normalizado usando K91kan como hospedador

(Sambrook *et al.*, 1989). Se repitieron los procesos de selección 3-5 veces para concentrar los clones positivos. A partir del segundo ciclo, las cantidades del ligando se disminuyeron gradualmente (hasta ~ 1 µg) y los ligandos biotinilados se mezclaron con una solución de fagos antes de transferirlos a una placa (G. P. Smith, comunicación personal). Tras el ciclo final, se repicaron 10-20 clones, y se determinó su secuencia de ADN. Se midieron las afinidades por el ligando de los clones, en primer lugar, mediante el método de fagos-ELISA (véase a continuación).

Para suprimir la unión potencial del marco de Fn3 (unión del fondo) a un ligando, se puede añadir a los tampones Fn3 natural como competidor. Además, se pueden usar proteínas no relacionadas (por ejemplo, albúmina de suero bovino, citocromo c y ARNasa A) como competidores para seleccionar monocuerpos muy específicos.

Ensayo de unión

Se caracterizó semicuantitativamente la afinidad de unión de los monocuerpos sobre la superficie del fago utilizando la técnica ELISA de fagos (Li *et al.*, 1995). Los pocillos de las placas de microvaloración (Nunc) se revistieron con una proteína de ligando (o con estreptavidina seguido por la unión de un ligando biotinilado) y se bloquearon con la solución Blotto (Pierce). Se añadieron fagos purificados (- 10¹⁰ ufp) originantes de placas (M13)/colonias (fUSE5) únicas a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4 °C. Tras lavar los pocillos con un tampón adecuado (véase anteriormente), se detectaron los fagos unidos mediante el protocolo ELISA normalizado utilizando Ab dirigido contra M13 (conejo, Sigma) y anticuerpo dirigido contra Ig de conejo conjugado con peroxidasa (Pierce) o utilizando anticuerpo peroxidasa contra M13 conjugado con peroxidasa (Pharmacia). Se llevaron a cabo ensayos colorimétricos utilizando TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Pierce). La elevada afinidad de la proteína G por las inmunoglobulinas presenta un problema especial; Los Ab no se pueden usar en la detección. Por tanto, para detectar los monocuerpos dirigidos contra la proteína G, se inmovilizaron fagos de fusión en pocillos y a continuación se midió la unión utilizando proteína G biotinilada seguida por detección utilizando conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

Producción de monocuerpos solubles

Tras la caracterización preliminar del mutante Fn3s utilizando el ELISA de fagos, los genes mutantes se subclonaron en el vector de expresión pEW1. Las proteínas mutantes se produjeron como proteínas de fusión His*tag y se purificaron, y se caracterizaron su conformación, estabilidad y afinidad por el ligando.

III. Estabilidad aumentada de las estructuras de Fn3

La definición de "mayor estabilidad" de una proteína es la capacidad de una proteína de retener su estructura tridimensional necesaria para la función a una temperatura mayor (en el caso de la desnaturalización térmica), y en presencia de una concentración superior de un reactivo químico desnaturalizante tal como clorhidrato de guanidina. Este tipo de "estabilidad" se denomina generalmente "estabilidad conformacional". Se ha mostrado que la estabilidad conformacional está correlacionada con la resistencia contra la degradación proteolítica, es decir, la rotura de la proteína en el cuerpo (Kamtekar *et al.* 1993).

Mejorar la estabilidad conformacional es una meta principal en la ingeniería de proteínas. Aquí, el inventor ha desarrollado mutaciones que potencian la estabilidad del dominio de tipo III de la fibronectina (Fn3). El inventor ha desarrollado una tecnología en la que se ha usado Fn3 como estructura principal para diseñar de proteínas de unión artificiales (Koide *et al.*, 1998). Se ha mostrado que muchos restos de las regiones bucle superficiales de Fn3 se pueden mutar sin perturbar la estructura global de la molécula de Fn3, y que se pueden diseñar variantes de Fn3 con función de unión novedosa utilizando un cribado de bibliotecas combinatorias (Koide *et al.*, 1998). El inventor ha descubierto que, aunque Fn3 es una excelente estructura principal, las variantes de Fn3 que contienen gran cantidad de mutaciones se desestabilizan frente a la desnaturalización química, en comparación con la proteína Fn3 natural (Koide *et al.*, 1998). De esta manera, como el número de posiciones mutadas está mutado para diseñar una nueva función de unión, la estabilidad de dichas variantes de Fn3 disminuye adicionalmente, dando lugar en última instancia a proteínas muy poco estables. Como las proteínas de unión artificiales deben mantener su estructura

tridimensional para ser funcionales, la estabilidad limita el número de mutaciones que se pueden introducir en la estructura principal. De esta manera, las modificaciones en la estructura principal de Fn3 que aumentan su estabilidad son útiles ya que permiten introducir más mutaciones para una función mejor, y porque posibilitan el uso de proteínas diseñadas basadas en Fn3 en una gama más amplia de aplicaciones.

El inventor ha descubierto que Fn3 natural es más estable a pH ácido que a pH neutro (Koide *et al.*, 1998). En la Figura 18 se caracteriza la dependencia de la estabilidad de Fn3 con el pH. La curva de dependencia del pH tiene un punto medio de transición aparente próximo a pH 4 (Figura 18). Estos resultados sugieren que mediante la identificación y la eliminación de las interacciones desestabilizantes de Fn3 se posibilita mejorar la estabilidad de Fn3 a pH neutro. Debe señalarse que la mayoría de aplicaciones de la Fn3 diseñada mediante ingeniería, tales como las diagnósticas, terapéuticas y de catalizadores, se espera que se aplican en la proximidad de pH neutro y, por tanto, es importante mejorar la estabilidad a pH neutro. Los estudios de otros investigadores han demostrado que la optimización de las propiedades electrostáticas superficiales puede conducir a un aumento sustancial en la estabilidad de la proteína (Perl *et al.* 2000, Spector *et al.* 1999, Loladze *et al.* 1999, Grimsley *et al.* 1999).

La dependencia de la estabilidad de Fn3 con el pH sugiere que los aminoácidos con pK_a próximo a 4 están implicados en la transición observada. Los grupos carboxilo del ácido aspártico (Asp) y el ácido glutámico (Glu) tienen un pK_a en este intervalo (Creighton, T.E. 1993). Es bien sabido que si un grupo carboxilo tiene interacciones desfavorables (*es decir*, desestabilizantes) en una proteína, su pK_a cambia a un valor mayor que su valor normalizado sin perturbar (Yang y Honig 1992). De esta manera, se determinaron los valores del pK_a de todos los grupos carboxilo en Fn3 utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), para identificar los grupos carboxilo con pK_a inusuales, tal como se muestra a continuación.

En primer lugar, se asignó la resonancia de ^{13}C al carbono del carboxilo de cada resto Asp y Glu (Figura 19). Tras la valoración del pH de ^{13}C se llevaron a cabo las resonancias para estos grupos (Figura 20). En la Tabla 3, se relacionan los valores del pK_a de estos restos.

Tabla 3. Valores del pK_a para los restos de Asp y Glu en Fn3.

Resto	pK_a
E9	5,09
E38	3,79
E47	3,94
D3	3,66
D7	3,54, 5,54*
D23	3,54, 5,25*
D67	4,18
D80	3,40

Las desviaciones estándar en los valores del pK_a son menores de 0,05 unidades de pH.

*Los datos de D7 y D23 se ajustaron con una curva de transición con dos valores de pK_a .

Estos resultados muestran que Asp 7 y 23, y Glu 9 tienen un desplazamiento del pK_a hacia arriba con respecto a sus pK_a sin perturbar (aproximadamente 4,0), indicando que estos restos están implicados en interacciones desfavorables. Por el contrario, los otros restos Asp y Glu tienen pK_a cercanos a los respectivos valores sin perturbar, indicando que los grupos carboxilo de estos restos no contribuyen significativamente a la estabilidad de Fn3.

En la estructura tridimensional de Fn3 (Main *et al.* 1992), Asp 7 y 23, y Glu 9 forma una almohadilla sobre la superficie (Figura 21), con Asp 7 localizado centralmente en la almohadilla. Esta proximidad espacial de estos restos cargados negativamente explica por qué estos restos tienen interacciones desfavorables en Fn3. A un pH bajo estos restos se protonan y se neutralizan, se espera que las interacciones desfavorables desaparezcan en su mayoría. Al mismo tiempo, la estructura sugiere que la estabilidad de Fn3 a pH neutro mejoraría si se eliminara la repulsión electrostática entre estos tres restos. Como Asp 7 se localiza centralmente entre los tres restos, se decidió mutar Asp 7. Se prepararon dos mutantes, D7N y D7K (es decir, el ácido aspártico del resto aminoácido número 7 se sustituyó con un resto asparagina o un resto lisina, respectivamente). El primero sustituye la carga negativa por un resto neutro que tiene virtualmente el mismo tamaño. El último introduce una carga positiva en el resto 7.

Se caracterizaron los grados de estabilidad de las proteínas mutantes con medidas de desnaturalización térmica y química. En las medidas de desnaturalización térmica, se vigiló la desnaturalización de las proteínas Fn3 utilizando espectroscopia de dicroísmo circular a la longitud de onda de 227 nm. Todas las proteínas experimentaron una transición cooperativa (Figura 22). A partir de las curvas de transición, se determinó que los puntos medios de la transición (T_m) para el tipo natural, D7N y D7K eran 62, 69 y 70 °C en tampón fosfato de sodio 0,02 M (pH 7,0) que

contenía cloruro de sodio 0,1 M y urea 6,2 M. De esta manera, las mutaciones aumentaron la T_m del Fn3 natural en 7-8 °C.

5 Se vigiló la desnaturalización química de las proteínas Fn3 utilizando emisión de fluorescencia procedente del único resto Trp de Fn3 (Figura 23). Se determinó que las energías libres del desplegado en ausencia de HCl de guanidina (ΔG^0) eran 7,4, 8,1 y 8,0 kcal/mol para el tipo natural, D7N y D7K, respectivamente (un ΔG^0 más grande indica una mayor estabilidad). Se encontró que los dos mutantes eran de nuevo más estables que la proteína natural.

10 Estos resultados muestran que una mutación puntual sobre la superficie puede potenciar significativamente la estabilidad de Fn3. Como estas mutaciones están sobre la superficie, alteran mínimamente la estructura de Fn3, y pueden introducirse fácilmente en otras proteínas Fn3 diseñadas mediante ingeniería. Además, las mutaciones en Glu 9 y/o Asp 23 potencian también la estabilidad de Fn3. Adicionalmente, las mutaciones pueden combinarse en uno o más de estos tres restos.

15 De esta manera, Fn3 es el cuarto ejemplo de estructura de tipo inmunoglobulina monomérica que se puede usar para las proteínas de unión diseñadas mediante ingeniería. La selección satisfactoria de novedosas proteínas de unión se ha basado también en minicuerpos, tendamistat y estructuras "camelizadas" del dominio VH de la inmunoglobulina (Martin *et al.*, 1994; Davies y Riechmann, 1995; McConnell y Hoess, 1995). La estructura de Fn3 tiene ventajas sobre estos sistemas. Bianchi *et al.* notificaron que la estabilidad de un minicuerpo era 2,5 kcal/mol, significativamente menor que la de Ubi4-K. No se ha notificado hasta la fecha caracterización estructural detallada de los minicuerpos. Tendamistat y el dominio VH contienen enlaces disulfuro y, por tanto, puede ser difícil la preparación de proteínas cargadas correctamente. Davies y Riechmann han notificado que los rendimientos de sus dominios VH camelizados fueron menores de 1 mg por litro de cultivo (Davies y Riechmann, 1996).

25 De esta manera, el marco de Fn3 puede utilizarse como una estructura principal para el reconocimiento molecular. Su pequeño tamaño, estabilidad y estructura bien caracterizada hacen de Fn3 un sistema atractivo. A la luz de la ubicua presencia de Fn3 en una amplia variedad de proteínas naturales implicadas en la unión del ligando, se pueden diseñar proteínas de unión basadas en Fn3 dirigidas a una clase diferente de dianas.

30 Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, pero no limiten la divulgación.

Ejemplo I

Construcción del gen Fn3

35 Se diseñó un gen sintético para la décima Fn3 de la fibronectina (Fig. 1) sobre la base del resto aminoácido 1416-1509 de la fibronectina humana (Kornblihtt, *et al.*, 1985) y su estructura tridimensional (Main, *et al.*, 1992). El gen se diseñó mediante ingeniería para incluir sitios de restricción convenientes para la mutagénesis y se utilizaron los denominados "codones preferidos" para la una expresión de proteína de alto nivel (Gribskov, *et al.*, 1984). Además, se insertó un resto de glutamina tras la metionina del extremo N para evitar el procesamiento parcial de la metionina del extremo N que degrada a menudo los espectros de RMN (Smith, *et al.*, 1994). Los reactivos químicos fueron de calidad analítica o de mejor calidad y se adquirieron en Sigma Chemical Company y J.T. Baker, a menos que se indique de otra manera. Se llevaron a cabo procedimientos de ADN recombinante como se describe en "Molecular Cloning" (Sambrook, *et al.*, 1989), salvo que se indique de otra manera. Se adquirieron oligonucleótidos personalizados en Operon Technologies. Las enzimas de restricción y modificación procedían de New England Biolabs.

50 El gen se ensambló de la siguiente manera. En primer lugar, la secuencia del gen (Fig. 5) se dividió en cinco partes con límites en los sitios de restricción diseñados: fragmento 1, NdeI-PstI (oligonucleótidos FN1F y FN1R (Tabla 2); fragmento 2, PstI-EcoRI (FN2F y FN2R); fragmento 3, EcoRI-Sall (FN3F y FN3R); fragmento 4, Sall-SacI (FN4F y FN4R); fragmento 5, SacI-BamHI (FN5F y FN5R). En segundo lugar, para cada parte, se sintetizó una pareja de oligonucleótidos que codifican hebras opuestas y tienen solapamientos complementarios de aproximadamente 15 bases. Estos oligonucleótidos se designaron FN1F-FN5R y se muestran en la Tabla 2. En tercer lugar, cada pareja (por ejemplo, FN1F y FN1R) se hibridó y se llenaron las regiones monocatenarias utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa. En cuarto lugar, el oligonucleótido bicatenario se digirió con las enzimas de restricción relevantes en los extremos del fragmento y se clonaron en el plásmido pBlueScript SK (Stratagene) que se había digerido con las mismas enzimas que las utilizadas para los fragmentos. Se confirmó la secuencia de ADN del fragmento insertado mediante secuenciación del ADN utilizando un secuenciador de ADN de Applied Biosystems y el protocolo de terminación dideoxi proporcionado por el fabricante. En último lugar, se repitieron las etapas 2-4 para obtener el gen completo.

65 El gen se clonó también en los vectores pET3a y pET15b (Novagen) (pAS45 y pAS25, respectivamente). Las cartografías de los plásmidos se muestran en las Figs. 6 y 7. *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) que contiene estos vectores expresó el gen Fn3 bajo el control del promotor del bacteriófago T7 (Studier, *et al.*, 1990); pAS24 expresa solamente la proteína Fn3 de 96 restos, mientras que pAS45 expresa Fn3 como una proteína de fusión con el

péptido poli-histidina (His•tag). Se detectó un nivel de expresión elevado de la proteína Fn3 y sus derivados en *E. coli* en forma de una banda intensa en SDS-PAGE teñido con CBB.

5 Se caracterizó cuantitativamente la reacción de unión de los monocuerpos por medio de espectroscopia de fluorescencia utilizando monocuerpos solubles purificados.

10 Se vigiló la fluorescencia intrínseca para medir las reacciones de unión. Se vigiló la fluorescencia de Trp (excitación a ~ 290 nm, emisión a 300-350 nm) y la fluorescencia de Tyr (excitación a ~ 260 nm, emisión a ~303 nm) a medida que la solución del mutante Fn3 ($\leq 100 \mu\text{M}$) se valoró con la solución de ligando. Cuando un ligando es fluorescente (por ejemplo, fluoresceína), se puede usar la fluorescencia procedente del ligando. Se determinará la K_d de la reacción mediante el ajuste de mínimos cuadrados no lineal de la ecuación de unión bimolecular.

15 Si no se puede utilizar la fluorescencia intrínseca para vigilar la reacción de unión, los monocuerpos se marcaron con fluoresceína-NHS (Pierce) y se usó la polarización de la fluorescencia para vigilar la reacción de unión (Burke *et al.*, 1996).

Ejemplo II

20 Modificaciones para incluir sitios de restricción en el gen Fn3

25 Se incorporaron sitios de restricción en el gen Fn3 sintético sin cambiar la secuencia de aminoácidos de Fn3. Se seleccionaron las posiciones de los sitios de restricción de tal manera que pudiera completarse la construcción del gen sin sintetizar oligonucleótidos largos (>60 bases) y para que se pudieran mutar dos regiones bucle (incluyendo mediante aleatorización) por el método de mutagénesis mediante casete (*es decir*, intercambiando un fragmento por otro fragmento sintético que contiene mutaciones). Además, se seleccionaron los sitios de restricción de tal manera que la mayoría de sitios eran únicos en el vector para la expresión del fago. Los sitios de restricción únicos permiten recombinar clones de monocuerpos que ya se han seleccionado para suministrar un espacio de la secuencia más grande.

30 Ejemplo III

Construcción de bibliotecas de expresión del fago M13

35 Se construyó de la siguiente forma un vector para la expresión del fago, pAS38 (para su cartografía, véase la Fig. 8). Se clonó el fragmento XbaI-BamHI de pET12a que codifica el péptido de señalización de OmpT en el extremo 5' del gen Fn3. La región del extremo C (procedente de los oligonucleótidos FN5F y FN5R, véase la Tabla 2) del gen Fn3 se sustituyó por un nuevo fragmento consistente en los oligonucleótidos FN5F y FN5R' (Tabla 2) que introdujeron un sitio MluI y una secuencia enlazadora para preparar una proteína de fusión con la proteína pIII del bacteriófago M13. Se preparó un fragmento del gen que codifica el dominio del extremo C de M13 pIII a partir del gen III natural de M13mp18 utilizando la PCR (Corey, *et al.*, 1993) y el fragmento se insertó en el extremo 3' del gen de fusión OmpT-Fn3 utilizando los sitios MluI y HindIII.

45 Los fagos se produjeron y purificaron utilizando un fago auxiliar, M13K07, de acuerdo con un método normalizado (Sambrook, *et al.*, 1989) excepto que las partículas del fago se purificaron mediante una segunda precipitación con polietileno. Se confirmó la expresión satisfactoria de Fn3 sobre los fagos de fusión mediante ELISA (Harlow y Lane, 1988) utilizando un anticuerpo contra fibronectina (Sigma) y un anticuerpo personalizado dirigido contra FN3 (Cocalico Biologicals, PA, EE.UU.).

50 Ejemplo IV

Bibliotecas que contienen variaciones del bucle en el bucle AB

55 Se preparó una biblioteca de expresión en fago de ácido nucleico que tenía una variación en el bucle AB mediante los siguientes métodos. Se consiguió la aleatorización mediante el uso de oligonucleótidos que contienen una secuencia de nucleótidos degenerada. Los restos que se iban a variar se identificaron examinando las estructuras de Fn3 mediante rayos X y RMN (números de acceso al Protein Data Bank 1FNA y 1TTF, respectivamente). Se sintetizaron oligonucleótidos que contenían NNK (N y K denotan aquí una mezcla equimolar de A, T, G, y C y una mezcla equimolar de G y T, respectivamente) para los restos variados (véanse por ejemplo los oligonucleótidos BC3, FG2, FG3, y FG4 en la tabla 2). La mezcla de NNK codifica los veinte aminoácidos y un codón de terminación (TAG). TAG, sin embargo, se suprimió en el *E. coli* XL-1 blue. Se prepararon los ADN monocatenarios de pAS38 (y sus derivados) utilizando un protocolo normalizado (Sambrook, *et al.*, 1989).

65 Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a sitio siguiendo los métodos publicados (véase, por ejemplo, Kunkel, 1985) usando un kit Muta-Gene (BioRad). Las bibliotecas se construyeron mediante electroporación de células *E. coli* XL-1 Blue competentes para electroporación (200 μl ; Stratagene) con 1 μg del ADN plásmido utilizando un equipo BTX Electrocell Manipulator ECM 395 con una cubeta de huego de 1 mm. Una parte de las células transformadas se

se sembró en una placa de agar LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) para determinar la eficacia de la transformación. Normalmente, se obtuvieron 3×10^8 transformantes con 1 µg of ADN y, por tanto, una biblioteca contiene de 10^8 a 10^9 clones independientes. Se prepararon partículas de fagémidos como se ha descrito anteriormente.

5 Ejemplo V

Variaciones de bucle en los bucles CD, DE, EF o FG

10 Se preparó una biblioteca de expresión en fagos de ácido nucleico que tiene cinco restos variados (restos números 26-30) en el bucle BC, y uno que tenía siete restos variados (restos números 78-84) en el bucle FG, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo IV anterior. Se pueden preparar otras bibliotecas de expresión en fagos de ácido nucleico que tenían variaciones en el bucle CD, DE o EF mediante métodos similares.

15 Ejemplo VI

Variaciones de bucle en el bucle FG y BC

20 Se preparó una biblioteca de expresión en fagos de ácido nucleico que tenía siete restos variados (restos números 78-84) en el bucle FG y cinco restos variados (restos números 26-30) en el bucle BC. Las variaciones del bucle BC se prepararon mediante mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel, *et al.*) usando el oligonucleótido BC3 descrito en la Tabla 1. Se introdujeron variaciones en el bucle FG utilizando mutagénesis dirigida al sitio utilizando la biblioteca de bucles BC como material de partida, dando como resultado de esta forma bibliotecas que contienen variaciones en los bucles BC y FG. El oligonucleótido FG2 tiene los restos variados 78-84 y el oligonucleótido FG4 tiene los restos

25 variados 77-81 y una delección de los restos 82-84.

Se preparó una biblioteca de expresión en fagos que tiene cinco restos variados (restos 78-84) en el bucle FG y una delección de tres restos (restos 82-84) en el bucle FG, y cinco restos variados (restos 26-30) en el bucle BC. Se preparó el bucle Fg más corto en un intento de reducir la flexibilidad del bucle FG; se había mostrado que el bucle era muy flexible en Fn3 mediante los estudios de RMN de Main, *et al.* (1992). Un bucle muy flexible puede ser una

30 desventaja para formar un sitio de unión con una elevada afinidad (se espera una pérdida de entropía grande tras la unión al ligando, ya que el bucle flexible debe volverse más rígido). Además, otros dominios Fn3 (además del humano) tienen bucles Fg más cortos (para la alineación de secuencias, véase la Figura 12 de Dickinson, *et al.* (1994)).

35 Se consiguió la aleatorización mediante el uso de oligonucleótidos que contenían secuencias de nucleótidos degeneradas (oligonucleótido BC3 para variar el bucle BC y los oligonucleótidos FG2 y FG4 para variar los bucles FG).

40 Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a sitio siguiendo los métodos publicados (véase, por ejemplo, Kunkel, 1985). Las bibliotecas se construyeron mediante electrotransformación de *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene). Normalmente, una biblioteca contiene de 10^8 a 10^9 clones independientes. La biblioteca 2 contiene cinco restos variados en el bucle BC y siete restos variados en el bucle FG. La biblioteca 4 contiene cinco restos variados en cada uno de los bucles BC y FG, y la longitud del bucle FG se acertó en tres restos.

45 Ejemplo VII

Bibliotecas de expresión del fago fd construidas con variaciones de bucle

50 Se construyeron bibliotecas de expresión en fagos utilizando el fago fd como vector genético. Se insertó el gen Fn3 en fUSE5 (Parmley y Smith, 1988) utilizando los sitios de restricción Sfil que se introdujeron en los extremos 5' y 3' del gen Fn3 utilizando la PCR. La expresión de este fago da como resultado la expresión de la proteína pIII de fusión sobre la superficie del fago fd. Se introdujeron variaciones en los bucles de Fn3 utilizando mutagénesis dirigida al sitio como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o subclonando las bibliotecas de Fn3 construidas

55 en el fago M13 en el vector fUSE5.

Ejemplo VIII

Otras bibliotecas de expresión en fagos

60 Bibliotecas del fago T7 (Novagen, Madison, WI) y los sistemas de expresión en pili bacterianos (Invitrogen) son también útiles para expresar el gen Fn3.

Ejemplo IX

65 Aislamiento de polipéptidos que se unen a estructuras macromoleculares

Se llevó a cabo la selección de monocuerpos expresados en fagos siguiendo los protocolos de Barbas y colaboradores (Rosenblum y Barbas, 1995). En resumen, aproximadamente 1 µg de una molécula diana ("antígeno") en tampón carbonato de sodio (100 mM, pH 8,5) se inmovilizó en los pocillos de una placa de microvaloración (Maxisorp, Nunc) incubando durante la noche a 4 °C en un recipiente hermético. Tras la eliminación de esta solución, los pocillos se bloquearon a continuación con una solución de BSA al 3 % (Sigma, Fracción V) en TBS incubando la placa a 37 °C durante 1 hora. Una solución de una biblioteca de fagémidos (50 µl) que contenía aproximadamente 10¹² unidades formadoras de colonias (ufc) de fagémidos, se absorbió en cada pocillo a 37 °C durante 1 hora. A continuación se lavaron los pocillos con un tampón adecuado (normalmente TBST, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,5 %) tres veces (una vez para el primer ciclo). Los fagos unidos se eluyeron mediante una solución ácida (normalmente, glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2; 50 µl) y el fago recuperado se neutralizó inmediatamente con 3 µl de solución Tris. Como alternativa, los fagos unidos se eluyeron incubando las células con 50 µl de TBS que contenía el antígeno (1 - 10 µM). Los fagos recuperados se amplificaron utilizando el protocolo normalizado que emplea células XL1Blue como hospedador (Sambrook, *et al.*). Se repitió el proceso de selección 5-6 veces para concentrar los clones positivos. Tras el ciclo final, los clones individuales se repicaron y se determinaron sus afinidades de unión y las secuencias de ADN.

Las afinidades de unión de los monocuerpos sobre la superficie del fago se caracterizaron usando la técnica ELISA de fagos (Li, *et al.*, 1995). Los pocillos de las placas de microvaloración (Nunc) se revistieron con un antígeno y se bloquearon con BSA. Los fagos purificados (10⁸- 10¹¹ ufc) originados a partir de una única colonia se añadieron a cada pocillo y se incubaron 2 horas a 37 °C. Tras lavar los pocillos con un tampón adecuado (véase anteriormente), se detectaron los fagos unidos mediante el protocolo ELISA normalizado utilizando un anticuerpo dirigido contra M13 (conejo, Sigma) y anticuerpo dirigido contra Ig de conejo conjugado con peroxidasa (Pierce). Se llevaron a cabo ensayos colorimétricos utilizando Turbo-TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Pierce) como sustrato.

Las afinidades de unión de los monocuerpos sobre la superficie del fago se caracterizaron adicionalmente el método ELISA de competición (Djavadi-Ohanian, *et al.*, 1996). En este experimento, el experimento ELISA de fagos se lleva a cabo de la misma manera que se ha descrito anteriormente, excepto que la solución de fagos contiene un ligando a concentraciones variadas. La solución de fagos se incubó a 4 °C durante una hora antes de la unión de un ligando inmovilizado en un pocillo de una placa de microvaloración. Las afinidades de los monocuerpos de expresión en fagos se estimaron mediante la disminución en la señal ELISA a medida que aumenta la concentración del ligando libre.

Tras la caracterización preliminar de los monocuerpos expresados sobre la superficie del fago utilizando el ELISA de fagos, se subclonaron los genes de los clones positivos en el vector de expresión pAS45. *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) se transformó con un vector de expresión (pAS45 y sus derivados). Las células se hicieron crecer en medio mínimo M9 y se suplementó el medio M9 con Bactotryptone (Difco) que contenía ampicilina (200 µg/ml). Para el marcado isotópico, ¹⁵N NH₄Cl y/o ¹³C glucosa sustituyó a los componentes no marcados. Los isótopos estables se adquirieron de Isotec y Cambridge Isotope Labs. 500 ml de medio en un matraz de 2 litros provisto de deflectores se inocularon con 10 ml de cultivo durante la noche y se agitaron a 37 °C a aproximadamente 37 °C. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína cuando la DO (600 nm) alcanzó aproximadamente 1,0. Se recogieron las células mediante centrifugación 3 horas después de la adición de IPTG y se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta que se utilizaron.

Fn3 y los monocuerpos con His•tag se purificaron como sigue. Se suspendieron las células en 5 ml/(g de célula) de Tris 50 mM (pH 7,6) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM. HEL (Sigma, 3X cristalizado) se añadió a una concentración final de 0,5 mg/ml. Tras incubar la solución durante 30 minutos a 37 °C, se sometió a ultrasonido para ocasionar la rotura de las células tres veces durante 30 segundos en hielo. Se retiraron los residuos celulares mediante centrifugación a 15.000 rpm en una centrífuga Sorval RC-2B utilizando un rotor SS-34. Se añadió cloruro sódico concentrado a la solución hasta una concentración final de 0,5 M. A continuación se aplicó la solución a una columna quelante HisTrap™ de 1 ml (Pharmacia) precargada con cloruro de níquel (0,1 M, 1 M) y se equilibró en el tampón Tris (50 mM, pH 8,0) que contenía cloruro de sodio 0,5 M. Tras lavar la columna con el tampón, la proteína unida se eluyó con un tampón Tris (50 mM, pH 8,0) que contenía imidazol 0,5 M. La porción His•tag se eliminó mediante escisión, según necesidad, por tratamiento de la proteína de fusión con trombina usando el protocolo suministrado por Novagen (Madison, WI). Fn3 se separó del péptido His•tag y la trombina mediante una columna Resources® (Pharmacia) utilizando un gradiente lineal de cloruro de sodio (0 - 0,5 M) en tampón acetato de sodio (20 mM, pH 5,0).

Se prepararon cantidades pequeñas de monocuerpos solubles como sigue. Células XL-1 Blue que contenían derivados de pAS38 (plásmidos que codifican proteínas de fusión Fn3-pIII) se hicieron crecer en medio LB a 37 °C con agitación intensa hasta que la DO (600 nm) alcanzó aproximadamente 1,0; se añadió IPTG al cultivo a una concentración final de 1 mM, y las células se hicieron crecer adicionalmente durante la noche a 37 °C. Las células se eliminaron del medio mediante centrifugación, y el sobrenadante se aplicó a un pocillo de microvaloración revestido con un ligando. Aunque las células XL-1 Blue que contienen pAS38 y sus derivados expresan las proteínas de fusión FN3-pIII, se produjeron también proteínas solubles debido a la escisión del enlazador entre las regiones Fn3 y pIII debido a las actividades proteolíticas de *E. coli* (Rosenblum y Barbas, 1995). Se examinó la unión de un monocuerpo al ligando mediante el protocolo de ELISA normalizado usando un anticuerpo personalizado contra Fn3

(adquirido de Cocalico Biologicals, Reamstown, PA). Se usaron también monocuerpos solubles obtenidos de la fracción periplásmica de células *E. coli* utilizando un método de choque osmótico normalizado.

Ejemplo X

Monocuerpo de unión a ubiquitina

La ubiquitina es una pequeña proteína (76 restos) implicada en las rutas de degradación eucariotas. Es una proteína globular de dominio único. Se adquirió ubiquitina de levadura de Sigma Chemical Company y se usó sin purificación adicional.

Se utilizaron las bibliotecas 2 y 4, descritas en el Ejemplo VI anterior, para seleccionar los monocuerpos de unión a ubiquitina. Se inmovilizó ubiquitina (1 µg en 50 µl de tampón bicarbonato de sodio (100 mM, pH 8,5)) en los pocillos de una placa de microvaloración, seguido por el bloqueo con BSA (3 % en TBS). Se llevó a cabo la adsorción como se ha descrito anteriormente. En los dos primeros ciclos, se inmovilizó 1 µg de ubiquitina por pocillo, y los fagos unidos se eluyeron con una solución ácida. Desde el tercer ciclo al sexto, se inmovilizaron 0,1 µg of de ubiquitina por pocillo y se eluyó el fago tanto con una solución ácida como con TBS que contiene ubiquitina 10 µM.

La unión de los clones seleccionados se sometió a ensayo, primero en modo policlonal, es *decir*, antes de aislar los clones individuales. Los clones seleccionados de todas las bibliotecas mostraron una unión significativa a la ubiquitina. Estos resultados se muestran en la Figura 9. La unión a la ubiquitina inmovilizada de los clones se inhibió casi completamente con menos de 30 µM de ubiquitina soluble en los experimentos del ELISA de competición (véase la Fig. 10). Las secuencias de los bucles BC y FG de los monocuerpos de unión a ubiquitina se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de monocuerpos de unión a ubiquitina

Nombre	Bucle BC	Bucle FG	Incidencia (de haber más de la unidad)
211	CARRA (SEC ID N°:31)	RWIPLAK (SEC ID N°:32)	2
212	CWRRRA (SEC ID N°:33)	RWVGLAW (SEC ID N°:34)	
213	CKHRR (SEC ID N°:35)	FADLWWR (SEC ID N°:36)	
214	CRRGR (SEC ID N°:37)	RGFMWLS (SEC ID N°:38)	
215	CNWRR (SEC ID N°:39)	RAYRYRW (SEC ID N°:40)	
411	SRLRR (SEC ID N°:41)	PPWRV (SEC ID N°:42)	9
422	ARWTL (SEC ID N°:43)	RRWWW (SEC ID N°:44)	
424	GQRTF (SEC ID N°:45)	RRWWA (SEC ID N°:46)	

El clon 411, que era el clon más enriquecido, se caracterizó usando el ELISA de fagos. El clon 411 mostró unión selectiva e inhibición de la unión en presencia de ubiquitina aproximadamente 10 µM en solución (Fig. 11).

Ejemplo XI

Métodos para la inmovilización de moléculas pequeñas

Se inmovilizaron moléculas diana en los pocillos de una placa de microvaloración (Maxisorp, Nunc) como se describe en el presente documento, y los pocillos se bloquearon con BSA. Además del uso de una proteína transportadora como se describe a continuación, se puede preparar un conjugado de una molécula diana en biotina. A continuación se puede inmovilizar el ligando biotinilado en un pocillo de una placa de microvaloración que se ha revestido con estreptavidina.

Además del uso de una proteína transportadora como se describe a continuación, se puede preparar un conjugado de una molécula diana y biotina (Pierce) e inmovilizar un ligando biotinilado en un pocillo de una placa de microvaloración que se ha revestido con estreptavidina (Smith y Scott, 1993).

Las moléculas pequeñas se pueden conjugar con una proteína transportadora tal como albúmina de suero bovino (BSA, Sigma), y adsorberse pasivamente en el pocillo de la placa de microvaloración. Como alternativa, se pueden usar también métodos de conjugación química. Además, se pueden emplear fácilmente soportes sólidos diferentes de las placas de microvaloración.

Ejemplo XII

Monocuerpo de unión a fluoresceína

Se ha utilizado la fluoresceína como diana en la selección de anticuerpos procedentes de bibliotecas combinatorias (Barbas, *et al.* 1992). Se obtuvo NSH-fluoresceína de Pierce y se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para preparar conjugados con BSA (Sigma). Se prepararon dos tipos de conjugados de fluoresceína-BSA con relaciones molares aproximadas de 17 (fluoresceína) a uno (BSA).

5 Se repitió el proceso de selección 5-6 veces para concentrar los clones positivos. En este experimento, la biblioteca de fagos se incubó con una mezcla de proteínas (BSA, citocromo C (Sigma, Caballo) y ARNasa (Sigma, Bovino), 1 mg/ml de cada uno) a temperatura ambiente durante 30 minutos, antes de la adición a pocillos revestidos con ligando. Los fagos unidos se eluyeron en TBS que contenía fluoresceína soluble 10 µM, en lugar de una elución con
 10 ácido. Tras el ciclo final, los clones individuales se repicaron (véase más adelante) y se determinaron sus afinidades de unión y las secuencias de ADN.

Tabla 5. Clones de la biblioteca nº 2

	BC	FG
WT	AVTVR (SEC ID Nº:47)	RGDSPAS (SEC ID Nº:48)
pLB24.1	CNWRR (SEC ID Nº:49)	RAYRYRW (SEC ID Nº:50)
pLB24.2	CMWRA (SEC ID Nº:51)	RWGMLRR (SEC ID Nº:52)
pLB24.3	ARMRE (SEC ID Nº:53)	RWLRGRY (SEC ID Nº:54)
pLB24.4	CARRR (SEC ID Nº:55)	RRAGWGW (SEC ID Nº:56)
pLB24.5	CNWRR (SEC ID Nº:57)	RAYRYRW (SEC ID Nº:58)
pLB24.6	RWRER (SEC ID Nº:59)	RHPWTER (SEC ID Nº:60)
pLB24.7	CNWRR (SEC ID Nº:61)	RAYRYRW (SEC ID Nº:62)
pLB24.8	ERRVP (SEC ID Nº:63)	RLLWQQR (SEC ID Nº:64)
pLB24.9	GRGAG (SEC ID Nº:65)	FGSFERR (SEC ID Nº:66)
pLB24.11	CRWTR (SEC ID Nº:67)	RRWFDGA (SEC ID Nº:68)
pLB24.12	CNWRR (SEC ID Nº:69)	RAYRYRW (SEC ID Nº:70)
Clones de la biblioteca nº 4		
WT	AVTVR (SEC ID Nº:71)	GRGDS (SEC ID Nº:72)
pLB25.1	GQRTF (SEC ID Nº:73)	RRWWA (SEC ID Nº:74)
pLB25.2	GQRTF (SEC ID Nº:75)	RRWWA (SEC ID Nº:76)
pLB25.3	GQRTF (SEC ID Nº:77)	RRWWA (SEC ID Nº:78)
pLB25.4	LRYRS (SEC ID Nº:79)	GWRWR (SEC ID Nº:80)
pLB25.5	GQRTF (SEC ID Nº:81)	RRWWA (SEC ID Nº:82)
pLB25.6	GQRTF (SEC ID Nº:83)	RRWWA (SEC ID Nº:84)
pLB25.7	LRYRS (SEC ID Nº:85)	GWRWR (SEC ID Nº:86)
pLB25.9	LRYRS (SEC ID Nº:87)	GWRWR (SEC ID Nº:88)
pLB25.11	GQRTF (SEC ID Nº:89)	RRWWA (SEC ID Nº:90)
pLB25.12	LRYRS (SEC ID Nº:91)	GWRWR (SEC ID Nº:92)

15 Se llevó a cabo la caracterización preliminar de las afinidades de unión de los clones seleccionados usando el ELISA de fagos y el ELISA de fagos de competición (véase la Fig. 12 (Fluoresceína-1) y la Fig. 13 (Fluoresceína-2)). Los cuatro clones sometidos a ensayo mostraron una unión específica a los pocillos revestidos con ligando, y las reacciones de unión se inhibieron mediante fluoresceína soluble (véase la Fig. 13).

20 Ejemplo XIII

Monocuerpo de unión a digoxigenina

25 Se usó ácido digoxigenina-3-O-metil-carbonilo-aminocaproico-NHS (Boehringer Mannheim) para preparar un conjugado de digoxigenina-BSA. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. El conjugado de digoxigenina-BSA se inmovilizó en los pocillos de una placa de microvaloración que se usó para la adsorción. Se repitió la adsorción 5 a 6 veces para enriquecer los clones de unión. Como la digoxigenina

es muy poco soluble en solución acuosa, los fagos unidos se eluyeron del pocillo usando una solución ácida. Véase el Ejemplo XIV.

Ejemplo XIV

5

Monocuerpos de unión a TSAC (compuesto análogo al estado de transición)

Se seleccionaron monocuerpos que hidrolizaban carbonato como sigue. Un análogo del estado de transición para la hidrólisis del carbonato, fosfonato de 4-nitrofenilo, se sintetizó mediante una reacción de Arbuzov como se ha descrito anteriormente (Jacobs y Schultz, 1987). El fosfonato se acopló a continuación a la proteína transportadora, BSA, utilizando carbodiimida, seguido por diálisis intensa (Jacobs y Schultz, 1987). El conjugado de hapteno-BSA se inmovilizó en los pocillos de una placa de microvaloración y la selección de monocuerpos se llevó a cabo una como se ha descrito anteriormente. Se sometieron a ensayo las actividades catalíticas de los monocuerpos seleccionados utilizando carbonato de 4-nitrofenilo como sustrato.

15

Otros haptenos útiles para producir monocuerpos catalíticos se resumen en H. Suzuki (1994) y en N. R. Thomas (1994).

Ejemplo XV

20

Caracterización de Fn3 mediante RMN y comparación entre el Fn3 secretado por levaduras con el secretado por *E. coli*

Se llevaron a cabo experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar la superficie de contacto entre FnAb y una molécula diana, *por ejemplo*, monocuerpos dirigidos contra fluoresceína, ubiquitina, ARNasa y derivados solubles de digoxigenina. La información se utiliza a continuación para mejorar la afinidad y especificidad del monocuerpo. Las muestras de monocuerpos purificados se disolvieron en un tampón adecuado para espectroscopia de RMN utilizando una celda de ultrafiltración Amicon con una membrana YM-3. Se prepararon tampones con H₂O al 90 %/ D₂O al 10 % (calidad destilada, Isotec) o con D₂O al 100 %. Los compuestos deuterados (por ejemplo, acetato) se utilizaron para eliminar las señales fuertes procedentes de los mismos.

25

30

Se llevaron a cabo experimentos de RMN en un espectrómetro Varian Unity INOVA 600 provisto de cuatro canales RF y una sonda de resonancia triple con capacidad de gradiente de campo pulsado. Se analizaron los espectros de RMN utilizando programas de procesamiento tales como Felix (Molecular Simulations), nmrPipe, PIPP, y CAPP (Garrett, *et al.*, 1991; Delaglio, *et al.*, 1995) en estaciones de trabajo UNIX. Se prepararon asignaciones de experiencias con resonancia específica usando una estrategia bien establecida que utilizaba un conjunto de experimentos de resonancia triple (CBCA(CO)NH y HNCACB) (Grzesiek y Bax, 1992; Wittenkind y Mueller, 1993).

35

Se observó el efecto Overhauser nuclear (NOE) entre los núcleos ¹H más cercanos de aproximadamente 5 Å, lo que permite obtener información acerca de las distancias interprotón. Se llevó a cabo una serie de experimentos de doble y triple resonancia (Tabla 6; para revisiones recientes de estas técnicas, véanse Bax y Grzesiek, 1993 y Kay, 1995) para determinar la distancia (*es decir*, NOE) y las restricciones del ángulo diédrico (acoplamiento J). Se llevaron a cabo experimentos filtrados por isótopo para determinar las asignaciones de resonancia del ligando unido y para obtener las restricciones de distancia dentro del ligando y las correspondientes entre FnAb y el ligando. Los detalles de las asignaciones de secuencias con resonancia específica y las asignaciones de picos NOE se han descrito detalladamente en otra parte (Clare y Gronenborn, 1991; Pascal, *et al.*, 1994b; Metzler, *et al.*, 1996).

40

45

Tabla 6. Experimentos de RMN para la caracterización de estructuras

Nombre del experimento	Referencia
1. espectros de referencia	
2D- ¹ H, ¹⁵ N-HSQC	(Bodenhausen y Ruben, 1980; Kay, <i>et al.</i> , 1992)
2D- ¹ H, ¹³ C-HSQC	(Bodenhausen y Ruben, 1980; Vuister y Bax, 1992)
2. asignaciones de resonancia de la estructura principal y la cadena secundaria de la proteína marcada con ¹³ C/ ¹⁵ N	
3D-CBCA(CO)NH	(Grzesiek y Bax, 1992)
3D-HNCACB	(Wittenkind y Mueller, 1993)
3D-C(CO)NH	(Logan <i>et al.</i> , 1992; Grzesiek, <i>et al.</i> , 1993)
3D-H(CCO)NH	
3D-HBHA(CBCACO)NH	(Grzesiek y Bax, 1993)
3D-HCCH-TOCSY	(Kay <i>et al.</i> , 1993)
3D-HCCH-COSY	(Ikura <i>et al.</i> , 1991)
3D- ¹ H, ¹⁵ N-TOCSY-HSQC	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)

Nombre del experimento	Referencia
2D-HB(CBCDCE)HE	(Yamazaki <i>et al.</i> , 1993)

3. asignaciones de resonancia del ligando no marcado

^1H -TOCSY filtrado por isótopo-2D	
^1H -COSY filtrado por isótopo-2D	
^1H -NOESY filtrado por isótopo-2D	(Ikura y Bax, 1992)

4. restricciones estructurales

dentro de la proteína marcada

3D- ^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)
4D- ^1H , ^{13}C -HMQC-NOESY-HMQC	(Vuister <i>et al.</i> , 1993)
4D- ^1H , ^{13}C , ^{15}N -HSQC-NOESY-HSQC	(Muhandiram <i>et al.</i> , 1993; Pascal <i>et al.</i> , 1994a)

dentro del ligando no marcado

^1H -NOESY filtrado por isótopo-2D	(Ikura y Bax, 1992)
---	---------------------

interacciones entre proteína y ligando

^1H filtrado por isótopo-3D, ^{15}N -NOESY-HSQC	
^1H filtrado por isótopo-3D, ^{13}C -NOESY-H	SQC (Lee <i>et al.</i> , 1994)

5. restricciones de ángulo diédrico

^1H modulado con J, ^{15}N -HSQC	(Billeter <i>et al.</i> , 1992)
3D-HNHB	(Archer <i>et al.</i> , 1991)

Se compararon las asignaciones de resonancia de la estructura principal obtenidas mediante ^1H , ^{15}N y ^{13}C para un monocuerpo con las obtenidas para el Fn3 natural con el fin de evaluar cambios estructurales en el mutante. Una vez que estos datos establecen que el mutante retiene la estructura global, se llevó a cabo el refinamiento estructural usando los datos experimentales de NOE. Como se espera que la diferencia estructural de un monocuerpo sea menor, se puede utilizar la estructura natural como modelo inicial tras modificar la secuencia de aminoácidos. Se introdujeron las mutaciones en la estructura natural mediante modelización molecular interactiva, y a continuación se minimizó la energía de la estructura utilizando un programa de modelización molecular tal como Quanta (Molecular Simulations). Se refinó la estructura de la solución utilizando ciclos de hibridación simulada dinámica (Nilges *et al.*, 1988) en el programa X-PLOR (Brünger, 1992). Normalmente, se calculó un conjunto de quince estructuras. Se confirmó la validez de las estructuras refinadas calculando un número menor de estructuras a partir de las estructuras iniciales generadas aleatoriamente en X-PLOR utilizando el protocolo YASAP (Nilges, *et al.*, 1991). Se calculó la estructura de un complejo monocuerpo-ligando refinando en primer lugar ambos componentes individualmente utilizando NOE intramoleculares, y a continuación anclando los dos utilizando NOE intermoleculares.

Por ejemplo, el espectro de ^1H , ^{15}N -HSQC del monocuerpo de unión a fluoresceína LB25.5 se muestra en la Figura 14. El espectro muestra una buena dispersión (los picos se diseminan) lo que indica que LB25.5 está plegado en conformación globular. Además, el espectro se asemeja al del Fn3 natural, mostrando que la estructura global de LB25.5 es similar a la de Fn3. Estos resultados demuestran que se pueden obtener monocuerpos de unión a ligando sin cambiar el pliegue global de la estructura de Fn3.

Se llevaron a cabo experimentos de perturbación del desplazamiento químico formando el complejo entre un FnAb marcado con isótopos y un ligando no marcado. La formación de un complejo estequiométrico se siguió mediante registro del espectro HSQC. Como el desplazamiento químico es extremadamente sensible al entorno nuclear, la formación de un complejo suele dar como resultado cambios sustanciales en el desplazamiento químico para las resonancias de restos de aminoácidos en la interfase. Se utilizaron experimentos de RMN editados por isótopo (HSQC 2D y CBCA(CO)NH) 3D para identificar las resonancias que están perturbadas en el componente marcado del complejo; es decir, el monocuerpo. Aunque siempre debe considerarse la posibilidad de artefactos debido a los cambios conformacionales de rango amplio, es más probable que surjan diferencias sustanciales para los restos agrupados en superficies continuas debido a los contactos directos (Chen *et al.*, 1993; Gronenbom y Clore, 1993).

Un método alternativo para cartografiar la superficie de interacción utiliza medidas de intercambio del hidrógeno de una amida (HX). Se midieron las tasas de HX para cada protón de amida de un monocuerpo marcado con ^{15}N tanto libre como complejo con un ligando. Se espera que la unión con el ligando dé como resultado la disminución de tasas de amida HX para los restos de monocuerpos en la interfase entre las dos proteínas, identificando de esta

manera la superficie de unión. Se midieron las tasas de HX para los monocuerpos del complejo permitiendo que HX apareciera durante un tiempo variable tras la transferencia del complejo a D₂O; el complejo se disoció disminuyendo el pH y se registró el espectro HSQC a pH bajo cuando la amida HX es lenta. Fn3 es estable y soluble a pH bajo, lo que satisface el prerrequisito de los experimentos.

5 Ejemplo XVI

Construcción y análisis del sistema de expresión de Fn3 específico de ubiquitina

10 Se diseñó y sintetizó un sistema de expresión de Fn3, se aislaron los clones de unión a ubiquitina, y se caracterizó biofísicamente un mutante Fn3 principal en estos clones.

15 La construcción de genes y la expresión en fagos de Fn3 se llevó a cabo como en los Ejemplos I y II anteriores. La proteína de fusión pIII del fago Fn3 se expresó a partir de un vector de expresión de fagémidos, mientras que el resto de componentes del fago M13, incluyendo el pIII natural, se produjeron utilizando un fago auxiliar (Bass *et al.*, 1990). Por tanto, un fago producido mediante este sistema debe incluir menos de una copia de Fn3 expresada sobre la superficie. Se detectó la expresión superficial de Fn3 sobre el fago mediante ELISA utilizando un anticuerpo dirigido contra Fn3. Solamente los fagos que contenían del vector de fusión Fn3-pIII reaccionaron con el anticuerpo.

20 Tras confirmar que la superficie del fago expresaba Fn3, se construyó una biblioteca de expresión en fagos de Fn3 como en el Ejemplo III. Las secuencias aleatorias se introdujeron en los bucles BC y FG. En la primera biblioteca se aleatorizaron cinco restos (77-81) y se eliminaron tres restos (82-84) del bucle FG. Se pretende que la delección reduzca la flexibilidad y aumente la afinidad por la unión del bucle FG. Se aleatorizaron también cinco restos (26-30) en el bucle BC para proporcionar una superficie de contacto más grande con la molécula diana. Por tanto, la biblioteca resultante contiene cinco restos aleatorizados en cada uno de los bucles BC y FG (Tabla 7). Esta biblioteca contenía aproximadamente 10⁸ clones independientes.

Cribado de bibliotecas

30 Se llevó a cabo el cribado de bibliotecas utilizando ubiquitina como molécula diana. En cada ciclo de adsorción se absorbieron fagos-Fn3 en una superficie revestida con ubiquitina, y los fagos unidos se eluyeron competitivamente con ubiquitina soluble. La relación de recuperación mejoró de 4,3 × 10⁻⁷ en el segundo ciclo a 4,5 × 10⁻⁶ en el quinto ciclo, lo que sugiere un enriquecimiento de los clones de unión. Tras cinco ciclos de adsorción, se determinaron las secuencias de aminoácidos de los clones individuales (Tabla 7).

35

Tabla 7. Secuencias de los bucles variados de clones enriquecidos

Nombre	BC bucle	Bucle FG	Frecuencia
Tipo natural	GCAGTTACCGTGCGT (SEC ID N°:93) AlaValThrValArg (SEC ID N°:94)	GGCCGTGGTGACAGCCCAGCGAGC (SEC ID N°:95) GlyArgGlyAspSerProAlaSer (SEC ID N°:96)	-
Biblioteca ^a	NNKNNKNNKNNKNNK X X X X X	NNKNNKNNKNNKNNK----- X X X X X (delección)	-
clon 1 (Ubi4)	TCGAGGTTGCGGCGG (SEC ID N°:97) SerArgLeuArgArg (SEC ID N°:98)	CCGCCGTGGAGGGTG (SEC ID N°:99) ProProTrpArgVal (SEC ID N°:100)	9
clon 2	GGTCAGCGAACTTTT (SEC ID N°:101) GlyGlnArgThrPhe (SEC ID N°:102)	AGGCGGTGGTGGGCT (SEC ID N°:103) ArgArgTrpTrpAla (SEC ID N°:104)	1
clon 3	GCGAGGTGGACGCTT (SEC ID N°: 105) AlaArgTrpThrLeu (SEC ID N°: 106)	AGGCGGTGGTGGTGG (SEC ID N°: 107) ArgArgTrpTrpTrp (SEC ID N°: 108)	1
^a N denota una mezcla equimolar de A, T, G y C; K denota una mezcla equimolar de G y T.			

Un clon, apodado Ubi4, dominó el combinado enriquecido de variantes de Fn3. Por tanto, la investigación adicional se centró en este clon Ubi4. Ubi4 contiene cuatro mutaciones en el bucle BC (se conservó Arg 30 en el bucle BC) y cinco mutaciones y tres delecciones en el bucle FG. De esta manera, el 13 % (12 de 94) de los restos se alteraron en Ubi4 con respecto a la secuencia natural.

40

La Figura 15 muestra un análisis ELISA de fagos de Ubi4. El fago Ubi4 se une a la molécula diana, ubiquitina, con una afinidad significativa, mientras que un fago que expresa el dominio Fn3 natural o una fase sin moléculas expresadas muestra poca unión detectable a la ubiquitina (Figura 15a). Además, el fago Ubi4 mostró un nivel algo elevado de unión de fondo a la superficie de control que carece de revestimiento de ubiquitina. Experimentos ELISA de competición muestran que la CI_{50} (concentración del ligando libre que produce una inhibición del 50 % de la unión) de la reacción de unión es aproximadamente de 5 μM (Fig. 15b). BSA, ribonucleasa A de bovino y citocromo C muestran poca inhibición de la reacción de unión a la ubiquitina Ubi4 (Figura 15c), lo que indica que la reacción de unión de Ubi4 a ubiquitina resulta de la unión específica.

10 Caracterización de una proteína de Fn3 mutante

El sistema de expresión dio como resultado 50-100 de proteína de Fn3 por litro de cultivo. Se observó un nivel de expresión de la proteína similar para el clon Ubi4 y otras proteínas de Fn3 mutantes.

15 Ubi4-Fn3 se expresó como una proteína independiente. Aunque la mayoría de Ubi4 se expresó en *E. coli* en forma de proteína soluble, se ha descubierto que su solubilidad era significativamente reducida en comparación de la de Fn3 natural. Ubi4 era soluble hasta -20 μM a pH bajo, con una solubilidad mucho menor a pH neutro. Esta solubilidad no era suficientemente alta para la caracterización estructural detallada utilizando la espectroscopia de RMN o la cristalografía de rayos X.

20 Se mejoró la solubilidad de Ubi4 añadiendo una cola de solubilidad, GKKGK (SEC ID N°:109), como extensión del extremo C. Se subclonó el gen de Ubi4-Fn3 en el vector de expresión pAS45 utilizando la PCR. Se incorporó la etiqueta de solubilización del extremo C, GKKGK (SEC ID N°:109), en esta etapa. *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) se transformó con el vector de expresión (pAS45 y sus derivados). Las células se hicieron crecer en medio mínimo M9 y se suplementó el medio M9 con Bactotryptone (Difco) que contenía ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Para el marcado isotópico, ^{15}N NH_4Cl sustituyó NH_4Cl sin marcar en el medio. 500 ml de medio en un matraz de 2 litros provisto de deflectores se inocularon con 10 ml de cultivo durante la noche y se agitaron a 37 °C. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para iniciar la expresión de la proteína cuando la DO (600 nm) alcanza el valor de la unidad. Se recogieron las células mediante centrifugación 3 horas después de la adición de IPTG y se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta que se utilizaron.

35 Las proteínas se purificaron como sigue. Se suspendieron las células en 5 ml/(g de célula) de Tris (50 mM, pH 7,6) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonio (1 mM). Se añadió lisozima de huevo de gallina (Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/ml. Tras incubar la solución durante 30 minutos a 37 °C, se sometió tres veces a ultrasonido durante 30 segundos en hielo. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación. Se añadió cloruro sódico concentrado a la solución hasta una concentración final de 0,5 M. La solución se aplicó a una columna quelante Hi-Trap (Pharmacia) precargada con níquel y equilibrada en tampón Tris que contenía cloruro de sodio (0,5 M). Tras lavar la columna con el tampón, se eluyó histag-Fn3 con el tampón que contenía imidazol 500 mM. La proteína se purificó adicionalmente utilizando una columna ResourceS (Pharmacia) con un gradiente de NaCl en un tampón acetato de sodio (20 mM, pH 4,6).

40 Con la cola GKKGK (SEC ID N°:109) se aumentó la solubilidad de la proteína Ubi4 hasta aproximadamente 1 mM a pH bajo y hasta -50 μM a pH neutro. Por tanto, se llevaron a cabo análisis adicionales sobre Ubi4 con esta extensión en el extremo C (denominada a partir de ahora como Ubi4-K). Se ha notificado que podría mejorarse significativamente la solubilidad de un minicuerpo mediante la adición de tres restos Lys en los extremos N o C (Bianchi *et al.*, 1994). En el caso de la proteína Rop, una cola en el extremo C no estructurada es fundamental para mantener su solubilidad (Smith *et al.*, 1995).

50 Se determinaron los estados de oligomerización de la proteína Ubi4 utilizando una columna de exclusión por tamaño. La proteína Fn3 natural era monomérica a pH bajo y neutro. Sin embargo, el pico de la proteína Ubi4-K era significativamente más amplio que el del Fn3 natural y se eluyó después de la proteína natural. Esto sugiere interacciones entre Ubi4-K y el material de la columna, que impide el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño para determinar el estado de oligomerización de Ubi4. Los estudios de RMN sugieren que la proteína es monomérica a pH bajo.

55 La proteína Ubi4-K retuvo una afinidad de unión con la ubiquitina que se resolvió por ELISA (Figura 15d). Sin embargo, un intento de determinar la constante de disociación utilizando un biosensor (Affinity Sensors, Cambridge, Reino Unido) fracasó debido a la elevada unión de fondo de Ubi4-K-Fn3 a la matriz del sensor. Esta matriz consiste principalmente en dextrano, que es consistente con la observación de que interacciones entre Ubi4-K interactúan con el dextrano reticulado de la columna de exclusión por tamaño.

Ejemplo XVII

60 Medidas de estabilidad de monocuerpos

65

Se siguieron las reacciones de desplegando y repliegado inducidas por clorhidrato de guanidina (GuHCl) midiendo la fluorescencia del triptófano. Se llevaron a cabo los experimentos en un espectrofluorómetro Spectronic AB-2 equipado con una jeringuilla motorizada (Hamilton Co.). La temperatura de la cubeta se mantuvo a 30 °C. El espectrofluorómetro y las jeringuillas se controlaron mediante un único ordenador utilizando una interfaz doméstica. Este sistema registra automáticamente una serie de espectros tras la valoración con GuHCl. Se inició un experimento con 1,5 ml de una solución tampón que contenía 5 μM de proteína. Se registró un espectro de emisión (300-400 nm; excitación a 290 nm) tras un retraso (3-5 minutos) después de cada inyección (50 o 100 μl) de una solución tampón que contenía GuHCl. Estas etapas se repitieron hasta que el volumen de la solución alcanzó la capacidad completa de una cubeta (3,0 ml). Las intensidades de la fluorescencia se normalizaron en forma de cocientes de la intensidad en un punto isofluorescente que se determinó en experimentos independientes. Las curvas de desplegando se ajustaron con un modelo en dos estados utilizando una rutina no lineal de mínimos cuadrados (Santoro y Bolen, 1988). No se observaron diferencias significativas entre experimentos con tiempos de retraso (entre una inyección y el inicio de adquisición del espectro) de 2 minutos y 10 minutos, lo que indica que las reacciones de desplegando/replegado alcanzaron prácticamente el equilibrio en cada punto de concentración en los tiempos de retraso utilizados.

Se midió la estabilidad conformacional de Ubi4-K utilizando el método de desplegando inducido por GuHCl descrito anteriormente. Las medidas se llevaron a cabo bajo dos conjuntos de condiciones; en primer lugar, a pH 3,3 en presencia de cloruro de sodio 300 mM, cuando Ubi4-K es muy soluble, y en segundo lugar en TBS, que se ha utilizado para el cribado de bibliotecas. En ambas condiciones, la reacción de desplegando fue reversible, y los inventores no detectaron signos de agregación o desplegando irreversible. La Figura 16 muestra las transiciones de desplegando de Ubi4-K Fn3 natural con la etiqueta del extremo N (his)₆ y la etiqueta de solubilidad del extremo C. La estabilidad del Fn3 natural no se vio afectada significativamente por la adición de estas etiquetas. En la Tabla 8 se relacionan los parámetros que caracterizan las transiciones de desplegando.

Tabla 8. Parámetros de estabilidad de Ubi4 y Fn3 natural determinados mediante el desplegando inducido por GuHCl

Proteína	ΔG_0 (kcal mol ⁻¹)	m_G (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)
Ubi4 (pH 7,5)	4,8 ± 0,1	2,12 ± 0,04
Ubi4 (pH 3,3)	6,5 ± 0,1	2,07 ± 0,02
Natural (pH 7,5)	7,2 ± 0,2	1,60 ± 0,04
Natural (pH 3,3)	11,2 ± 0,1	2,03 ± 0,02

ΔG_0 es la energía libre de desplegando en ausencia de desnaturante; m_G es la dependencia de la concentración de GuHCl con la energía libre de desplegando. En condiciones de solución, véase la captura de la Figura 4.

Aunque las mutaciones introducidas en los dos bucles disminuyen ciertamente la estabilidad de Ubi4-K con respecto a Fn3 natural, la estabilidad de Ubi4 sigue siendo comparable a la de una proteína globular "típica". Debe señalarse también que las estabilidades de las proteínas naturales y Ubi4-K son mayores a pH 3,3 que a pH 7,5.

La proteína Ubi4 tuvo una solubilidad significativamente reducida en comparación con la de Fn3 natural, pero la solubilidad de mejoró mediante la adición de una cola de solubilidad. Como los dos bucles mutados incluyen solamente diferencias entre las proteínas naturales y Ubi4, estos bucles deben ser el origen de la solubilidad reducida. En ese momento, no está claro si la agregación de Ubi4-K está producida por interacciones entre los bucles, o por interacciones entre los bucles y las regiones invariables de la estructura de Fn3.

La proteína Ubi4-K retuvo el pliegue global de Fn3, lo que muestra que esta estructura puede acomodar un gran número de mutaciones en los dos bucles sometidos a ensayo. Aunque la estabilidad de la proteína Ubi4-K es significativamente menor que la de la proteína Fn3 natural, la proteína Ubi4 sigue teniendo una estabilidad conformacional comparable a la de las proteínas globulares pequeñas. El uso de un dominio muy estable como una estructura principal es claramente una ventaja para introducir mutaciones sin afectar el pliegue global de la estructura. Además, el desplegando de la proteína Ubi4 inducido por GuHCl es casi completamente reversible. Esto permite la preparación de una proteína plegada correctamente incluso cuando el mutante Fn3 se expresa en una forma plegada incorrectamente, como en los cuerpos de inclusión. La modesta estabilidad de Ubi4 en las condiciones utilizadas para el cribado de bibliotecas indica que las variantes de Fn3 están plegadas en la superficie del fago. Esto sugiere que un clon Fn3 se selecciona por su afinidad de unión en la forma plegada, no en una forma desnaturada. Dickinson *et al.* proponen que Val 29 y Arg 30 en el bucle BC estabilizan Fn3. Val 29 entra en contacto con el núcleo hidrófobo, y Arg 30 forma enlaces de hidrógeno con Gly 52 y Val 75. En Ubi4-Fn3, Val 29 se sustituye por Arg, mientras que Arg 30 se conserva. El bucle FG se mutó también en la biblioteca. Este bucle es flexible en la estructura natural, y muestra una gran variación en la longitud entre los dominios Fn3 humanos (Main *et al.*, 1992). Estas observaciones sugieren que las mutaciones en el bucle FG pueden tener menos impacto sobre la estabilidad. Además, la cola del extremo N de Fn3 es adyacente a la superficie molecular formada por los bucles BC y FG (Figura 1 y 17) y no forma una estructura bien definida. No se espera que las mutaciones en la cola del extremo N tengan efectos perjudiciales fuertes sobre la estabilidad. Por tanto, los restos de la cola del extremo N pueden ser sitios buenos para introducir mutaciones adicionales.

Ejemplo XVIII

Espectroscopía de RMN de Ubi4-Fn3

5 Ubi4-Fn3 se disolvió en tampón [²H]-Gly HCl (20 mM, pH 3,3) que contenía NaCl (300 mM) utilizando una unidad de ultrafiltración Amicon. La concentración final de proteína fue 1 mM. Se llevaron a cabo experimentos de RMN en un espectrómetro Varian Unity INOVA 600 provisto de una sonda de resonancia triple con capacidad de gradiente de campo pulsado. La temperatura de la sonda se ajustó a 30 °C. Se registraron los espectros HSQC, TOCSY-HSQC y NOESY-HSQC utilizando procedimientos publicados (Kay *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994). Los espectros de RMN se procesaron y analizaron utilizando el programa informático NMRPipe y NMRView (Johnson y Blevins, 1994; Delaglio *et al.*, 1995) en estaciones de trabajo UNIX. Se prepararon las asignaciones de resonancia específicas de secuencia utilizando procedimientos normalizados (Wüthrich, 1986; Clore y Gronenborn, 1991). Las asignaciones de Fn3 natural (Baron *et al.*, 1992) se confirmaron utilizando un tampón de acetato de sodio disuelto en proteína marcada con ¹⁵N (50 mM, pH 4,6) a 30 °C.

15 La estructura tridimensional de Ubi4-K se caracterizó utilizando este método de espectroscopía de RMN heteronuclear. Se pudo recoger un espectro de alta calidad en una solución 1 mM de Ubi4 marcado con ¹⁵N (Figura 17a) a pH bajo. La anchura de línea de los picos de amida de Ubi4-K fue similar a la del Fn3 natural, lo que sugiere que Ubi4-K es monomérico en las condiciones utilizadas. Se consiguieron asignaciones completas para los núcleos de ¹H y ¹⁵N de la estructura utilizando técnicas normalizadas de resonancia doble de ¹H, ¹⁵N, excepto para una hilera de restos His en la etiqueta del extremo N (His)₆. Existen unos pocos picos débiles en el espectro HSQC que aparentemente se han originado a partir de especies menores que contenían el resto Met del extremo N. El análisis de espectrometría de masas mostró que la mayoría de Ubi4-K no contiene el resto Met del extremo N. La Fig. 17 muestra las diferencias en los desplazamientos químicos de ¹H y ¹⁵N entre Ubi4-K y Fn3 natural. Solamente se observaron pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos, salvo para los incluidos dentro y cerca de los bucles BC y FG mutados. Estos resultados indican claramente que Ubi4-K retiene el pliegue global de Fn3, a pesar de las extensas mutaciones en los dos bucles. Unos pocos restos de la región del extremo N, que está cercana a los dos bucles mutados, presentan también diferencias químicas significativas entre las dos proteínas. Se registró también un espectro HSQC en una muestra 50 µM de Ubi4-K en TBS. El espectro era similar al recogido a pH bajo, indicando que la conformación global de Ubi4 se mantiene entre pH 7,5 y 3,3.

Ejemplo XIX:

35 Estabilización del dominio Fn3 eliminando interacciones electrostáticas desfavorables sobre la superficie de la proteína

Introducción

40 Aumentar la estabilidad conformacional de una proteína mediante mutación es de mayor interés en el diseño y biotecnología de proteínas. Las estructuras tridimensionales de las proteínas se estabilizan mediante combinación de diferentes tipos de fuerzas. El efecto hidrófobo, interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno son conocidos por contribuir a estabilizar el estado plegado de las proteínas (Kauzmann, W. (1959) *Adv. Prot. Chem.* 14, 1-63; Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* 29, 7133-7155; Pace, C. N., Shirley, B.A., McNutt, M. y Gajiwala, K. (1996) *Faseb J* 10, 75-83). Estas fuerzas estabilizantes se originan principalmente de restos que están bien empaquetados en una proteína, tal como la que constituye el núcleo hidrófobo. Puesto que un cambio en el núcleo de la proteína induciría una reordenación de los restos adyacentes, es difícil aumentar la estabilidad de la proteína aumentando estas fuerzas sin cálculo informático masivo (Malakauskas, S. M. y Mayo, S. L. (1998) *Nat Struct Biol* 5, 470-475). Los pares de iones entre grupos cargados se encuentran habitualmente sobre la superficie de la proteína (Creighton, T. E. (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, Freeman, Nueva York), y se podría introducir un par de iones en una proteína con pequeñas perturbaciones estructurales. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la introducción de una interacción electrostática atractiva, tal como un par de iones, sobre la superficie de la proteína tiene pequeños efectos sobre la estabilidad (Dao-pin, S., Sauer, U., Nicholson, H. y Matthews, B. W. (1991) *Biochemistry* 30, 7142-7153; Sali, D., Bycroft, M. y Fersht, A. R. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 779-788). Una penalización por desolvatación importante, así como la pérdida de la entropía conformacional de las cadenas secundarias de aminoácidos, se oponen a la contribución electrostática favorable (Yang, A.-S. y Honig, B. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2,40-45; Hendsch, Z. S. y Tidor, B. (1994) *Protein Sci.* 3.211-226). Estudios recientes han demostrado que las interacciones electrostáticas repulsoras sobre la superficie de la proteína, por el contrario, pueden desestabilizar significativamente una proteína, y que es posible aumentar la estabilidad de la proteína optimizando las interacciones electrostáticas superficiales (Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. y Makhatadze, G. I. (1999) *Biochemistry* 38, 16419-16423; Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. y Schmid, F. X. (2000) *Nat Struct Biol* 7, 380-383; Spector, S., Wang, M., Carp, S. A., Robblee, J., Hendsch, Z. S., Fairman, R., Tidor, B. y Raleigh, D. P. (2000) *Biochemistry* 39, 872-879; Grimsley, G. R., Shaw, K. L., Fee, L. R., Alston, R. W., Huyghues-Despointes, B. M., Thurlkill, R. L., Scholtz, J. M. y Pace, C. N. (1999) *Protein Sci* 8, 1843-1849). En los presentes experimentos, el inventor ha mejorado la estabilidad de la proteína modificando las interacciones electrostáticas superficiales.

Durante la caracterización de los monocuerpos se descubrió que estas proteínas, así como FNfn10 natural, son significativamente más estables a pH bajo que a pH neutro (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151). Estas observaciones indican que los cambios en el estado de ionización de algunos restos en FNfn10 modulan la estabilidad conformacional de la proteína, y sugieren que podría ser posible aumentar la estabilidad conformacional de FNfn10 a pH neutro ajustando las propiedades electrostáticas de la proteína. La mejora en la estabilidad conformacional de FNfn10 tendrá también importancia práctica en el uso de FNfn10 como estructura principal en las aplicaciones de biotecnología.

Se describen a continuación experimentos que detallan la caracterización de la dependencia del pH de la estabilidad de FNfn10, identifican interacciones desfavorables entre los grupos carboxilo de las cadenas secundarias, y aumentan la estabilidad conformacional de FNfn10 mediante mutaciones puntuales sobre la superficie. Los resultados demuestran que las interacciones electrostáticas superficiales contribuyen significativamente a la estabilidad de la proteína, y que es posible aumentar la estabilidad de la proteína modulando lógicamente estas interacciones.

Procedimientos experimentales

Expresión y purificación de proteínas

La proteína natural utilizada en los estudios de RMN contenía los restos 1-94 de FNfn10 (la numeración de los restos sigue la Figura 2(a) de Koide et al. (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151)), y dos restos adicionales (Met-Gln) en el extremo N (estos dos restos se numeran -2 y -1, respectivamente). El gen que codificaba la proteína se insertó en pET3a (Novagen, WI). Se hizo crecer *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con el vector de expresión en medio mínimo M9 mínimo suplementado con ¹³C-glucosa y ¹⁵N-cloruro de amonio (Cambridge Isotopes) como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Se indujo la expresión de la proteína como se ha descrito anteriormente (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151). Tras recoger las células mediante centrifugación, las células se lisaron como se ha descrito (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151). Tras la centrifugación, el sobrenadante se dializó frente a tampón acetato de sodio 10 mM (pH 5,0), y la solución de proteínas se aplicó a una columna SP-Sepharose FastFlow (Amersham Pharmacia Biotech), y FN3 se eluyó con un gradiente de cloruro de sodio. La proteína se concentró utilizando un concentrador Amicon usando una membrana YM-3 (Millipore).

La proteína natural utilizada para las medidas de estabilidad contenía una etiqueta his en el extremo N (MGSSHHHHHSSGLVPRGSH) (SEC ID N°:114) y los restos -2-94 de FNfn10. El gen de FN3 descrito anteriormente se insertó en pET15b (Novagen). La proteína se expresó y purificó como se ha descrito (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151). La proteína natural utilizada en las medidas de dependencia del pH que se muestra en la Figura 22 contenía la mutación de Arg6 a Thr, que se había introducido originalmente para eliminar un sitio de escisión secundario de la trombina (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151). Como se ha descubierto que Asp 7, que es adyacente a Arg 6, es fundamental en la dependencia de la estabilidad de FN3 con el pH, como se ha detallado en la sección Resultados, se realizaron estudios posteriores utilizando un fondo de Arg 6 natural. Se construyeron los genes de los mutantes D7N y D7K utilizando reacciones en cadena de la polimerasa normalizadas, y se insertaron en pET15b. Estas proteínas se prepararon de la misma manera que la proteína natural. Se prepararon proteínas marcadas con ¹³C, ¹⁵N para las medidas del pK_a como se ha descrito anteriormente, y el resto de la etiqueta his no se eliminó de estas proteínas.

Medidas de desnaturalización química

Se disolvieron las proteínas hasta una concentración final de 5 μM en tampón citrato de sodio 10 mM que contenía cloruro de sodio 100 mM a varios pH. Se llevaron a cabo experimentos de desplegamiento inducidos por HCl guanidina (GuHCl) como se ha descrito anteriormente (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151; Koide, S., Bu, Z., Risal, D., Pham, T.-N., Nakagawa, T., Tamura, A. y Engelman, D. M. (1999) Biochemistry 38, 4757-4767). Se determinó la concentración de GuHCl utilizando un refractómetro Abbe (Spectronic Instruments) como se ha descrito (Pace, C. N. y Sholtz, J. M. (1997) en Protein structure. A practical approach (Creighton, T. E., Ed.) Vol. pp299-321, IRL Press, Oxford). Se analizaron los datos de acuerdo con el modelo de dos estados que se ha descrito (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151; Santoro, M. M. y Bolen, D. W. (1988) Biochemistry 27, 8063-8068).

Medidas de desnaturalización térmica

Se disolvieron las proteínas hasta una concentración final de 5 μM en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) que contenía cloruro sódico 0,1 o 1 M o en tampón de HCl de glicina 20 mM (pH 2,4) que contenía cloruro de sodio 0,1 o 1 M. Adicionalmente, se incluyó urea 6,3 M en todas las soluciones para asegurar la reversibilidad de la reacción de desnaturalización térmica. En ausencia de urea, se ha descubierto que FNfn10 desnaturalizado se adhiere a la superficie de cuarzo, y que la reacción de desnaturalización térmica era irreversible. Se llevaron a cabo medidas de

dicroísmo circular utilizando un espectrómetro Model 202 equipado con un controlador de temperatura Peltier (Aviv Instruments). Se usó una cubeta con una longitud de camino de 0,5 cm. Se registró la elipticidad a 227 nm a medida que la temperatura de la muestra aumentaba a una velocidad de aproximadamente 1 °C por minuto. Debido a la descomposición de la urea a elevada temperatura, el pH de las soluciones de proteínas tendió a desplazarse hacia arriba durante un experimento. Se midió el pH de la solución de proteína antes y después de cada medida de desnaturalización térmica para asegurar que no se produjo un desplazamiento de más de 0,2 unidades de pH en cada medida. A pH 2,4, se adquirieron dos secciones de una curva de desnaturalización térmica (30-65 °C y 60-95 °C) a partir de muestras separadas, para evitar un desplazamiento de pH grande. Se ajustaron los datos de desnaturalización térmica al modelo de dos estados normalizado (Pace, C. N. y Sholtz, J. M. (1997) en Protein structure. A practical approach (Creighton, T. E., Ed.) Vol. pp299-321, IRL Press, Oxford):

$$\Delta G(T) = \Delta H_m (1 - T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T/T_m)]$$

donde $\Delta G(T)$ es la energía libre de Gibbs de desplegado a la temperatura T , ΔH_m es la variación en la entalpía tras el desplegado en el punto medio de la transición, T_m , y ΔC_p es la variación en la capacidad calorífica el desplegado. El valor de ΔC_p se fijó a $1,74 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, de acuerdo con la aproximación de Myers et al. (Myers, J. K., Pace, C. N. y Scholtz, J. M. (1995) Protein Sci. 4,2138-2148). La mayoría de los conjuntos de datos tomados en presencia de NaCl 1 M no tienen un valor inicial suficiente para el estado desplegado, y por tanto se ha supuesto que la pendiente del valor inicial desplegado en presencia de NaCl 1 M era idéntica a la determinada en presencia de NaCl 0,1 M.

Espectroscopía de RMN

Se llevaron a cabo experimentos de RMN a 30 °C en un espectrómetro INOVA 600 (Varian Instruments). El experimento C(CO)NH (Grzesiek, S., Anglister, J. y Bax, A. (1993) J. Magn. Reson. B 101, 114-119) y el experimento CBCACOA (Kay, L. E. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115, 2055-2057) se recogieron en una muestra de FNfn10 natural [^{13}C , ^{15}N] (1 mM) disuelta en tampón acetato de sodio 50 mM (pH 4,6) que contenía óxido de deuterio al 5 % (v/v), utilizando una sonda de resonancia triple de 5 mm Varian con gradiente de campo pulsado. Se asignaron resonancias al carboxilo ^{13}C basándose en las asociaciones de resonancia de ^1H , ^{13}C y ^{15}N de la estructura principal de FNfn10 (Baron, M., Main, A. L., Driscoll, P. C., Mardon, H. J., Boyd, J. y Campbell, I. D. (1992) Biochemistry 31, 2068-2073). Se llevó a cabo la valoración del pH de las resonancias del carboxilo en una muestra de FNfn10 0,3 mM disuelta en citrato de sodio 10 mM que contenía cloruro de sodio 100 mM y óxido de deuterio al 5 % (v/v). Para valorar el pH se utilizó una sonda con gradiente de campo pulsado (Nanolac Corporation) para resonancia triple de 8 mm. Se recogieron los espectros bidimensionales H(C)CO utilizando la secuencia de pulsos CBCACOA como se ha descrito anteriormente (McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Koerner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W. y Withers, S. G. (1996) Biochemistry 35, 9958-9966). Se cambió el pH de la muestra añadiendo pequeñas alícuotas de ácido clorhídrico, y se midió el pH antes y después de tomar los datos de RMN. Los espectros de ^1H , ^{15}N -HSQC se adquirieron como se ha descrito anteriormente (Kay, L. E., Keifer, P. y Saarinen, T. (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 10663-10665). Se procesaron los datos de RMN utilizando el paquete NMRPipe (Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. y Bax, A. (1995) J. Biomol. NMR 6, 277-293), y se analizaron utilizando el software NMRView (Johnson, B. A. y Blevins, R. A. (1994) J. Biomol. NMR 4, 603-614).

Las curvas de valoración de RMN de las resonancias del carboxilo ^{13}C se ajustaron a la ecuación de Henderson-Hasselbalch para determinar los pK_a :

$$\delta(pH) = (\delta_{acid} + \delta_{base} 10^{(pH-pK_a)}) / (1 + 10^{(pH-pK_a)})$$

donde δ es el desplazamiento químico medido, δ_{acid} es el desplazamiento químico asociado con el estado protonado, δ_{base} es el desplazamiento químico asociado con el estado desprotonado, y pK_a es el valor del pK_a para el resto. Los datos también se ajustaron a una ecuación con dos grupos ionizables:

$$\delta(pH) = (\delta_{AH2} + \delta_{AH} 10^{(pH-pK_{a1})} + \delta_A 10^{(2pH-pK_{a1}-pK_{a2})}) / (1 + 10^{(pH-pK_{a1})} + 10^{(2pH-pK_{a1}-pK_{a2})})$$

donde δ_{AH2} , δ_{AH} y δ_A son los desplazamientos químicos asociados con los estados completamente protonados, singularmente protonados y desprotonados, respectivamente, y pK_{a1} y pK_{a2} son los pK_a asociados con las dos etapas de ionización. Se llevó a cabo el ajuste de los datos utilizando el método de regresión de mínimos cuadrados no lineal con el programa Igor Pro (WaveMetrix, OR) en un ordenador Macintosh.

Resultados

Dependencia de la estabilidad de FNfn10 con el pH

Anteriormente se había encontrado que FNfn10 era más estable a pH ácido que a pH neutro (Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) J. Mol. Biol. 284, 1141-1151). En los presentes experimentos, se caracterizó adicionalmente la dependencia del pH de su estabilidad. Debido a su elevada estabilidad, FNfn10 podría no desnaturizarse completamente en urea a 30 °C. Por tanto, se utilizó la desnaturalización química inducida por GuHCl (Figura 18). La reacción de desnaturalización era completamente reversible en todas las condiciones ensayadas. Para minimizar los errores producidos por la extrapolación, se usó la energía libre del desplegado en GuHCl 4 M para comparación (Figura 18). La estabilidad aumentó a medida que disminuía el pH, con mesetas evidentes en ambos extremos del intervalo de pH. La curva de dependencia del pH tiene un punto medio de transición aparente próximo a pH 4. Además, de un aumento gradual en el valor de m , se señaló la dependencia de la energía libre del desplegado con la concentración de desnaturalizante. Pace *et al.* notificaron una dependencia del pH similar del valor de m para bamasa (Pace, C. N., Laurents, D. V. y Erickson, R. E. (1992) Biochemistry 31, 2728-2734). Estos resultados indican que FNfn10 contiene interacciones que estabilizan la proteína a pH bajo, o que la desestabilizan a pH neutro. Los resultados sugieren también que mediante la identificación y alteración de las interacciones que ocasionan la dependencia del pH, se puede aumentar la estabilidad de FNfn10 a pH neutro hasta un grado similar al que se encuentra a pH bajo.

Determinación de los pK_a de los grupos carboxilo de la cadena secundaria en el FNfn10 natural

La dependencia de la estabilidad de FNfn10 con el pH sugiere que los aminoácidos con pK_a próximo a 4 están implicados en la transición observada. Los grupos carboxilo de Asp y Glu tienen generalmente un pK_a en este intervalo (Creighton, T. E. (1993) Proteins: structures and molecular properties, Freeman, Nueva York). Es bien sabido que si un grupo carboxilo tiene interacciones desfavorables (es decir, desestabilizantes) en el estado plegado, su pK_a cambia a un valor mayor a partir de su valor sin perturbar (Yang, A.-S. y Honig, B. (1992) Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 40-45). Si un grupo carboxilo tiene interacciones favorables en el estado plegado, tiene un pK_a menor. Por tanto, se determinaron los valores de pK_a de todos los carboxilatos de FNfn10 utilizando espectroscopia de RMN heteronuclear para identificar las interacciones estabilizantes y desestabilizantes que implican grupos carboxilo.

En primer lugar, se asignó la resonancia de ^{13}C al carbono del carboxilo de cada resto Asp y Glu en FN3 (Figura 19). A continuación, se llevó a cabo la valoración del pH de las resonancias de ^{13}C para estos grupos (Figura 20). Las curvas de valoración de Asp 3, 67 y 80, y Glu 38 y 47 se pudieron ajustar bien a la ecuación de Henderson-Hasselbalch con un único pK_a . Los valores del pK_a para estos restos (Tabla 9) están bien próximos o bien son algo menores que sus respectivos valores sin perturbar (3,8-4,1 para Asp, y 4,1-4,6 para Glu (Kuhlman, B., Luisi, D. L., Young, P. y Raleigh, D. P. (1999) Biochemistry 38, 4896-4903)), lo que indica que estos grupos carboxilo están implicados en las interacciones electrostáticas neutras o ligeramente favorables en el estado plegado.

Tabla 9. Valores del pK_a para los restos de Asp y Glu en FN3¹.

Resto	Proteína		
	Tipo natural	D7N	D7K
E9	3,84, 5,40 ²	4,98	4,53
E38	3,79	3,87	3,86
E47	3,94	3,99	3,99
D3	3,66	3,72	3,74
D7	3,54, 5,54 ²	-	-
D23	3,54, 5,25 ²	3,68	3,82
D67	4,18	4,17	4,14
D80	3,40	3,49	3,48

¹Las desviaciones estándar de los valores del pK_a son menores que 0,05 unidades de pH para aquellos ajustes con un único pK_a y menos de 0,15 unidades de pH para aquellos con dos pK_a .

² Los datos para E9, D7 y D23 se ajustaron con una curva de transición con dos valores de pK_a .

Las curvas de valoración para Asp 7 y 23, y Glu 9 se ajustaron mejor con la ecuación de Henderson-Hasselbalch con dos valores de pK_a , y uno de los dos valores de pK_a se desplazó por encima de los respectivos valores sin perturbar (Figura 19B). Las curvas de valoración con dos valores de pK_a aparentes de estos grupos carboxilo pueden deberse a la influencia de un grupo ionizable cercano. En la estructura tridimensional de FNfn10 (Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. y Campbell, I. D. (1992) Cell 71, 671-678), Asp 7 y 23, y Glu 9 forma una almohadilla sobre la superficie (Figura 21), con Asp 7 localizado centralmente en la almohadilla. Por tanto, es razonable esperar que cada uno de estos restos afecte a los perfiles de ionización del otro. Para identificar cuál de los tres restos tenía un pK_a , muy desplazado, se adquirió seguidamente el espectro H(C)CO de la proteína en tampón D₂O al 99 % a pH* 5,0 (lectura directa con pH-metro). Asp23 y Glu 9 mostraron desplazamientos más grandes del isótopo de deuterio (0,33 y 0,32 ppm, respectivamente) que Asp 7 (0,18 ppm). Estos resultados

muestran que Asp 23 y Glu 9 se protonan hasta un grado mayor que Asp 7. Por tanto, los inventores concluyeron que Asp 23 y Glu 9 tienen desplazamientos del pK_a muy hacia arriba debido a la fuerte influencia de Asp7.

Análisis mutacional

La proximidad espacial de Asp 7 y 23, y Glu 9 explica las interacciones electrostáticas desfavorables del FNfn10 identificado en este estudio. A un pH bajo estos restos se protonan y se neutralizan, se espera que las interacciones de repulsión desaparezcan en su mayoría. Por tanto, debería ser posible aumentar la estabilidad de FNfn10 a pH neutro, eliminando la repulsión electrostática entre estos tres restos. Como Asp 7 se localiza centralmente entre los tres restos, se decidió mutar Asp 7. Se prepararon dos mutantes, D7N y D7K. El primero neutraliza la carga negativa con un resto de tamaño virtualmente idéntico. El último coloca una carga positiva en el resto 7 y aumenta el tamaño de la cadena secundaria.

Los espectros de 1H , ^{15}N -HSQC de las dos proteínas mutantes eran casi idénticos a los de la proteína natural, lo que indica que estas mutaciones no producen grandes perturbaciones estructurales (no se muestran los datos). A continuación se caracterizaron los grados de estabilidad de las proteínas mutantes utilizando medidas de desnaturalización térmica y química. Se realizaron medidas de desnaturalización térmica inicialmente con cloruro de sodio 100 mM, y se incluyó urea 6,3 M para asegurar la desnaturalización reversible y para disminuir la temperatura de la transición térmica. Todas las proteínas se plegaron predominantemente en urea 6,3 M a temperatura ambiente. Todas las proteínas experimentaron una transición cooperativa, y se encontró que los dos mutantes eran significativamente más estables que el natural a pH neutro (Figura 22 y Tabla 10). Además, estas mutaciones eliminaron prácticamente la dependencia de la estabilidad conformacional de FNfn10 con el pH. Estos resultados confirmaron que las interacciones desestabilizantes que implicaban Asp 7 en el FNfn10 natural a pH neutro son la causa principal de la dependencia del pH.

Tabla 10. El punto medio de la desnaturalización térmica (en $^{\circ}C$) de la proteína natural y FN3 mutante en presencia de urea 6,3 M.

Proteína	pH 2,4		pH 7,0	
	NaCl 0,1 M	NaCl 1 M	NaCl 0,1 M	NaCl 1 M
tipo natural	72	82	62	70
D7N	68	82	69	80
D7K	69	77	70	78

El error en los puntos medios de los datos de NaCl 0,1 M es de $\pm 0,5$ $^{\circ}C$. Como la mayoría de los datos del NaCl 1 M no tienen un valor inicial suficiente para el estado desnaturalizado, se estimó que el error en los puntos medios para estos datos era de ± 2 $^{\circ}C$.

Se investigó a continuación el efecto del aumento de concentración del cloruro de sodio sobre la estabilidad conformacional de las proteínas naturales y de las dos proteínas mutantes. Todas las proteínas fueron más estables en cloruro de sodio 1 M que en cloruro de sodio 0,1 M (Figura 22). El aumento en la concentración de cloruro de sodio elevó la T_m de las proteínas mutantes en aproximadamente 10 $^{\circ}C$ a pH ácido y neutro (Tabla 10). De forma notable, la proteína natural se estabilizó igualmente a ambos pH, aunque incluye interacciones desfavorables entre los grupos carboxilo a pH neutro, pero no a pH ácido.

Se vigiló la desnaturalización química de las proteínas FNfn10 utilizando emisión de fluorescencia procedente del único resto Trp de FNfn10 (Figura 23). Se determinó que las energías libres del desplegado a pH 6,0 y GuHCl 4 M eran 1,1 ($\pm 0,3$), 1,7 ($\pm 0,2$) y 1,4 ($\pm 0,1$) kcal/mol para el tipo natural, D7N y D7K, respectivamente, los que indica que las dos mutaciones aumentaron también la estabilidad conformacional frente a la desnaturalización química.

Determinación de los pK_a de los grupos carboxilo de la cadena secundaria en las proteínas mutantes

Se investigaron las propiedades de ionización de los grupos carboxilo en las dos proteínas mutantes. Los espectros 2D H(C)CO de las proteínas mutantes en los extremos alto y bajo de la valoración del pH (pH ~ 7 y $\sim 1,5$, respectivamente) fueron casi idénticos a los espectros respectivos del tipo natural, excepto por la pérdida de los picos cruzados de Asp 7 (no se muestran los datos). Esta similitud permitió una asignación sin ambigüedad de las resonancias de los mutantes, basándose en las asignaciones de FNfn10 natural. Los experimentos de valoración del pH revelaron que, excepto para Glu 9 y Asp 23, los comportamientos de los grupos carboxilo de Asp y Glu están muy próximos a sus homólogos en la proteína natural (Figura 24, Paneles A, C, D, F y G, y Tabla 9), lo que indica que las dos mutaciones tienen efectos marginales sobre los entornos electrostáticos de estos carboxilatos. Por el contrario, las curvas de valoración de E9 y D23 muestran cambios significativos tras la mutación (Figura 24 Paneles B y E). Se disminuyó el pK_a de D23 en más de 1,6 y 1,4 pH unidades en los mutantes D7N y D7K, respectivamente. Estos resultados muestran claramente que la interacción repulsora entre D7 y D23 contribuye al aumento del pK_a de Asp 23 en la proteína natural, y que se ha eliminado mediante la neutralización de la carga negativa del resto 7. El pK_a de Glu 9 se redujo en 0,4 unidades de pH por la mutación D7N, mientras que disminuyó en 0,8 unidades de pH

en el mutante D7K. La reducción mayor del pK_a de Glu 9 por la mutación D7K sugiere que existe una interacción favorable entre Lys 7 y Glu 9 en esta proteína mutante.

Discusión

5 El presente inventor ha identificado interacciones electroestáticas desfavorables en FNfn10, y ha mejorado su estabilidad conformacional mediante mutaciones sobre la superficie de la proteína. Los resultados demuestran que las interacciones de repulsión entre cargas similares sobre la superficie de la proteína desestabilizan significativamente la proteína. Los resultados son también consistentes con los informes recientes de otros grupos (Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. y Makhatadze, G. I. (1999) *Biochemistry* 38, 16419-16423; Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. y Schmid, F. X. (2000) *Nat Struct Biol* 7, 380-383; Spector, S., Wang, M., Carp, S. A., Robblee, J., Hendsch, Z. S., Fairman, R., Tidor, B. y Raleigh, D. P. (2000) *Biochemistry* 39, 872-879; Grimsley, G. R., Shaw, K. L., Fee, L. R., Alston, R. W., Huyghues-Despointes, B. M., Thurlkill, R. L., Scholtz, J. M. y Pace, C. N. (1999) *Protein Sci* 8, 1843-1849), en los que se ha mejorado la estabilidad de la proteína eliminando las interacciones electrostáticas de la superficie. En dichos estudios, los candidatos para las mutaciones se identificaron mediante cálculos electrostáticos (Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. y Makhatadze, G. I. (1999) *Biochemistry* 38, 16419-16423; Spector, S., Wang, M., Carp, S. A., Robblee, J., Hendsch, Z. S., Fairman, R., Tidor, B. y Raleigh, D. P. (2000) *Biochemistry* 39, 872-879; Grimsley, G. R., Shaw, K. L., Fee, L. R., Alston, R. W., Huyghues-Despointes, B. M., Thurlkill, R. L., Scholtz, J. M. y Pace, C. N. (1999) *Protein Sci* 8, 1843-1849) o mediante comparación de secuencias de proteínas homólogas con diferente estabilidad (Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. y Schmid, F. X. (2000) *Nat Struct Biol* 7, 380-383). La presente estrategia que utiliza la determinación del pK_a utilizando RMN tiene ventajas y desventajas sobre las otras estrategias. El presente método identifica directamente los restos que desestabilizan una proteína. Análogamente, esto no depende de la disponibilidad de la estructura de alta resolución de la proteína de interés. Los cálculos electrostáticos pueden tener errores importantes debidos a la flexibilidad de las cadenas secundarias de los aminoácidos sobre la superficie, y de la incertidumbre en la constante dieléctrica sobre la superficie de la proteína y en el interior de la proteína. Por ejemplo, en la estructura de la RMN de FNfn10 (Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. y Campbell, I. D. (1992) *Cell* 71, 671-678), las desviaciones cuadráticas medias entre 16 estructuras modelo para el átomo O^ε de los restos Glu son 1,2-2,4 Å, y para los átomos N^δ de Lys son 1,5-3,1 Å. Dichas incertidumbres en la posición del átomo pueden producir potencialmente grandes diferencias en los resultados del cálculo. Por otra parte, la presente estrategia requiere las asignaciones de RMN de los restos carboxilo, y medidas de RMN en un amplio intervalo de pH. Aunque recientes avances en la espectroscopia de RMN han hecho permitido obtener directamente las asignaciones de RMN de una proteína pequeña, algunas proteínas pueden no ser suficientemente solubles en el intervalo de pH deseado. Además, el conocimiento de los valores del pK_a de los grupos ionizables en el estado deseado es necesario para evaluar con precisión las contribuciones de los restos individuales a la estabilidad (Yang, A.-S. y Honig, B. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2,40-45). Kuhlman *et al.* (Kuhlman, B., Luisi, D. L., Young, P. y Raleigh, D. P. (1999) *Biochemistry* 38, 4896-4903) mostraron que los pK_a de los carboxilatos en estado desnaturalizado tienen un intervalo considerablemente más grande que los obtenidos a partir de los compuestos del modelo pequeño. A pesar de estas limitaciones, el presente método es aplicable a muchas proteínas.

40 El inventor ha demostrado que las interacciones desfavorables que implican a los grupos carboxilo de Asp 7, Glu 9 y Asp23 ya no estarían presentes si estos grupos se protonaran a pH bajo o si Asp 7 se sustituyera por Asn o Lys. La similitud en la estabilidad medida de los mutantes y el tipo natural a pH bajo (Tabla 10) sugiere que no existen otros factores que contribuyan significativamente a la dependencia de la estabilidad de FNfn10 con el pH y que las mutaciones produjeron mínimas perturbaciones estructurales. Se esperaba poca perturbación estructural, ya que los grupos carboxilo de estos tres restos están expuestos en al menos un 50 % al disolvente, basándose en el cálculo del área superficial accesible al disolvente de la estructura de RMN (Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. y Campbell, I. D. (1992) *Cell* 71, 671-678).

50 La diferencia en la estabilidad térmica de la proteína natural entre pH ácido y neutro persistió en cloruro de sodio 1 M (Tabla 10). Del mismo modo, la proteína natural presentó una gran dependencia del pH sobre la estabilidad en GuHCl 4 M (Figura 18). Además, tras aumentar la concentración del cloruro de sodio de 0,1 a 1,0 M, la T_m de las proteínas naturales y mutantes aumentó en ~10 °C, que es la misma magnitud que el cambio en la T_m del tipo natural debido al desplazamiento del pH. Estos datos indican que las interacciones desfavorables identificadas en este estudio no fueron eficazmente apantalladas en NaCl 1 M o en GuHCl 4 M. Como el efecto de aumento en el cloruro de sodio fue uniforme, este efecto de estabilización del cloruro de sodio se debe probablemente al efecto de desalación no específico (Timasheff, S. N. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 35-39). Otros grupos notificaron también poco efecto de apantallamiento de sales sobre las interacciones electrostáticas (Perutz, M. F., Gronenborn, A. M., Clore, G. M., Fogg, J. H. y Shih, D. T. (1985) *J Mol Biol* 183, 491-498; Hendsch, Z. S., Jonsson, T., Sauer, R. T. y Tidor, B. (1996) *Biochemistry* 35, 7621-7625). Frecuentemente se piensa que las interacciones electrostáticas disminuyen con el aumento de la fuerza iónica, particularmente, si el sitio de la interacción está muy expuesto. De acuerdo con ello, los presentes datos a pH neutro (Tabla 10) no muestran diferencias en la sensibilidad salina entre el tipo natural y los mutantes lo que podría interpretarse como que Asp 7 no es responsable de las interacciones electrostáticas desestabilizantes. Aunque el motivo de esta insensibilidad salina no sea todavía evidente, los presentes resultados proporcionan una nota de advertencia concluyente sobre la presencia y ausencia de interacciones electrostáticas basadas únicamente en la dependencia de la concentración salina.

La tríada carboxilo (Asp 7 y 23, y Glu 9) está muy conservada en FNfn10 de nueve organismos diferentes que estaban disponibles en el banco de datos de secuencias de proteínas del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). En estas secuencias de FNfn10, Asp 9 está conservada, salvo en un caso donde está sustituida por Asn, y Glu 9 está completamente conservado. La posición 23 es tanto Asp como Glu, conservando la carga negativa. Como se ha descubierto en este estudio, las interacciones entre estos restos son desestabilizantes. Por tanto, su elevada conservación, a pesar de sus efectos negativos sobre la estabilidad, sugiere que estos restos tienen importancia funcional en la biología de la fibronectina. En la estructura de un segmento de cuatro FN3 de la fibronectina humana (Leahy, D. J., Aukhil, I. y Erickson, H. P. (1996) *Cell* 84, 155-164), estos restos no están implicados directamente en interacciones con dominios adyacentes. Análogamente, estos restos están localizados en la cara opuesta de FNfn10 desde la secuencia de RGD de unión a la integrina en el bucle FG (Figura 21). Por tanto, no está claro porqué estos restos desestabilizantes están casi completamente conservados en FNfn10. Por el contrario, ningún otro dominio FN3 de la fibronectina humana contiene esta tríada carboxilo (para una alineación de secuencias, véase la ref. Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. y Campbell, I. D. (1992) *Cell* 71, 671-678). La tríada carboxilo de FNfn10 puede estar implicada en interacciones importantes que no se han identificado hasta la fecha.

Clarke et al. (Clarke, J., Hamill, S. J. y Johnson, C. M. (1997) *J Mol Biol* 270, 771-778) notificaron que la estabilidad del tercer FN3 de la tenascina humana (TNfn3) aumenta a medida que se disminuye el pH de 7 a 5. Aunque no pudieron realizar medidas de estabilidad por debajo de pH 5 debido a la agregación de proteínas, la dependencia de TNfn3 con el pH se asemeja a la de FNfn10 que se muestra en la Figura 18. TNfn3 no contiene la tríada carboxilato en las posiciones 7, 9 y 23 (Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I. y Erickson, H. P. (1992) *Science* 258, 987-991), lo que indica que la desestabilización de TNfn3 a pH neutro se produce por un mecanismo diferente del de FNfn10. Una inspección visual de la estructura de TNfn3 reveló que esta tiene un gran número de grupos carboxilo, y que Glu 834 y Asp 850 (numeración de acuerdo con la ref. Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I. y Erickson, H. P. (1992) *Science* 258, 987-991) forma una pareja de hebras cruzadas. Será interesante examinar si la alteración de esta pareja puede aumentar la estabilidad de TNfn3.

En conclusión, se ha descrito una estrategia para identificar experimentalmente las interacciones electrostáticas desfavorables sobre la superficie de la proteína y aumentar la estabilidad de la proteína aliviando dichas interacciones. Los presentes resultados han demostrado que formar una interacción repulsora entre grupos carboxilo desestabiliza significativamente una proteína. Esto se diferencia de las pequeñas contribuciones de formar un par iónico expuesto a disolvente. Las interacciones electrostáticas desfavorables sobre la superficie parecen ser muy habituales en las proteínas naturales. Por tanto, la optimización de las propiedades electrostáticas superficiales proporciona una estrategia de aplicación general para aumentar la estabilidad de la proteína (Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. y Makhatadze, G. I. (1999) *Biochemistry* 38, 16419-16423; Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. y Schmid, F. X. (2000) *Nat Struct Biol* 7, 380-383; Spector, S., Wang, M., Carp, S. A., Robblee, J., Hendsch, Z. S., Fairman, R., Tidor, B. y Raleigh, D. P. (2000) *Biochemistry* 39, 872-879; Grimsley, G. R., Shaw, K. L., Fee, L. R., Alston, R. W., Huyghues-Despointes, B. M., Thurlkill, R. L., Scholtz, J. M. y Pace, C. N. (1999) *Protein Sci* 8, 1843-1849). Además, las interacciones de repulsión entre carboxilatos pueden explicarse para desestabiliza conformaciones alternativas indeseables en el diseño de proteínas ("diseño negativo").

Ejemplo XX

Una extensión del extremo carboxilo de la estructura del monocuerpo

En el Ejemplo 19 se describe la proteína natural utilizada para las medidas de estabilidad. El término carboxilo de la estructura del monocuerpo se extendió en cuatro restos aminoácidos, concretamente, los restos aminoácidos (Glu-Ile-Asp-Lys) (SEC ID N^o:119), que son los que siguen inmediatamente a FNfn10 en la fibronectina humana. La extensión se introdujo en el gen FNfn10 utilizando métodos de la PCR convencionales. Las medidas de la estabilidad se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 19. La energía libre del desplegado de la proteína extendida fue de 7,4 kcal mol⁻¹ a pH 6,0 y 30 °C, muy cercana a la de la proteína natural (7,7 kcal mol⁻¹). Estos resultados demuestran que el extremo C de la estructura del monocuerpo puede estar extendido sin que disminuya su estabilidad.

La anterior descripción detallada y los ejemplos se han proporcionado solamente con fines de claridad y comprensión. No deben extraerse limitaciones innecesarias a partir de lo anterior. La divulgación no se limita a los detalles exactos que se muestran y describen para las variaciones evidentes para un experto en la materia, que se incluirán en alcance definido por las reivindicaciones.

REFERENCIAS

- Alzari, P.N., Lascombe, M.-B. y Poljak, R.J. (1988) Three-dimensional structure of antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 555-580.
- Archer, S. J., Ikura, M., Torchia, D. A. y Bax, A. (1991) An alternative 3D NMR technique for correlating backbone ¹⁵N with side chain H¹ resonances in large proteins *J. Magn. Reson.* 95, 636-641.

- Aukhil, I., Joshi, P., Yan, Y. y Erickson, H. P. (1993) Cell- and heparin-binding domains of the hexabrachion arm identified by tenascin expression protein *J. Biol. Chem.* 268, 2542-2553.
- Barbas, C. F., III, Kang, A. S., Lerner, R. A. y Benkovic, S. J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7978-7982.
- 5 Barbas, C. F., III, Bain, J. D., Hoekstra, D. M. y Lerner, R. A. (1992) Semisynthetic combinatorial libraries: A chemical solution to the diversity problem *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,4457-4461.
- Baron, M., Main, A. L., Driscoll, P. C., Mardon, H. J., Boyd, J. y Campbell, I.D. (1992) ¹H NMR assignment and secondary structure of the cell adhesion type II module of fibronectin *Biochemistry* 31, 2068-2073.
- Baron, M., Norman, D. G. y Campbell, I. D. (1991) Protein modules *Trends Biochem. Sci.* 16, 13-17.
- 10 Bass, S., Greene, R. y Wells, J. A. (1990) Hormone phage: An enrichment method for variant proteins with altered binding properties *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 8, 309-314.
- Bax, A. y Grzesiek, S. (1993) Methodological advances in protein NMR. *Acc. Chem. Res.* 26, 131-138.
- Becktel, W. J. y Schellman, J. A. (1987) Protein stability curves. *Biopolymer* 26, 1859-1877.
- Bhat, T. N., Bentley, G. A., Boulot, G., Greene, M. I., Tello, D., Dall'acqua, W., Souchon, H., Schwarz, F. P.,
 15 Mariuzza, R. A. y Poljak, R. J. (1994) Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1089-1093.
- Bianchi, E., Venturini, S., Pessi, A., Tramontano, A. y Sollazzo, M. (1994) High level expression and rational mutagenesis of a designed protein, the minibody. From an insoluble to a soluble molecule. *J. Mol. Biol.* 236, 649-659.
- Billeter, M., Neri, D., Otting, G., Qian, Y. Q. y Wüthrich, K. (1992) Precise vicinal coupling constants ³J_{HNA} in proteins from nonlinear fits of J-modulated [¹⁵N, ¹H]-COSY experiments. *J. Biomol. NMR* 2,257-274.
- 20 Bodenhausen, G. y Ruben, D. J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 69, 185-189.
- Bork, P. y Doolittle, R. F., *PNAS* 89:8990-8994 (1992).
- Bork, P. y Doolittle, R. F. (1992) Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8990-8994.
- 25 Bork, P., Horn, L. y Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* 242, 309-320.
- Brunger, A. T. (1992) X-PLOR (Version 3.1): A system for X-ray crystallography and NMR., Yale Univ. Press, New Haven.
- 30 Burke, T., Bolger, R., Checovich, W. y Lowery, R. (1996) in *Phage display of peptides and proteins* (Kay, B. K., Winter, J. and McCafferty, J., Ed.) Vol. pp305-326, Academic Press, San Diego.
- Campbell, I. D. y Spitzfaden, C. (1994) Building proteins with fibronectin type III modules *Structure* 2, 233-337.
- Chen, Y., Reizer, J., Saier, M. H., Fairbrother, W. J. y Wright, P. E. (1993) Mapping the binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIA_{glc}. *Biochemistry* 32, 32-37.
- 35 Clarke, J., Hamill, S. J. y Johnson, C. M. (1997) *J Mol Biol* 270, 771-778.
- Clackson y Wells, (1994) *Trends Biotechnology* 12, 173-184.
- Clore, G. M. y Gronenborn, A. M. (1991) Structure of larger proteins in solution: Three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* 252, 1390-1399.
- Corey, D. R., Shiau, A. K., Q., Y., Janowski, B. A. y Craik, C. S. (1993) Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene* 128, 129-134.
- 40 Cota, E. y Clarke, J. (2000) *Protein Sci* 9, 112-120.
- Creighton, T. E. (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, Freeman, New York.
- Dao-pin, S., Sauer, U., Nicholson, H. y Matthews, B. W. (1991) *Biochemistry* 30, 7142-7153.
- Davies, J. y Riechmann, L. (1996). Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein Eng.*, 9(6), 531-537.
- 45 Davies, J. y Riechmann, L. (1995) Antibody VH domains as small recognition units. *Bio/Technol.* 13, 475-479.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. y Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-293.
- Deng, W. P. y Nickoloff, J. A. (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200, 81-88.
- 50 deVos, A. M., Ultsch, M. y Kossiakoff, A. A. (1992) Human Growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.
- Dickinson, C. D., Veerapandian, B., Dai, X.P., Hamlin, R. C., Xuong, N.-H., Ruoslahti, E. y Ely, K. R. (1994) Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin *J. Mol. Biol.* 236, 1079-1092..
- 55 Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* 29, 7133-7155.
- Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M. E. y Friguet, B. (1996) in *Antibody Engineering. A Practical Approach* (McCafferty, J., Hoogenboom, H. R. and Chiswell, D. J., Ed.) Vol. pp. 77-97, Oxford Univ. Press, Oxford.
- Dougall, W. C., Peterson, N. C. y Greene, M. I. (1994) Antibody-structure-based design of pharmacological agents. *Trends Biotechnol.* 12, 372-379.
- 60 Garrett, D. S., Powers, R., Gronenborn, A. M. y Clore, G. M. (1991) A common sense approach to peak picking in two-, three- and four-dimensional spectra using automatic computer analysis of contour diagrams. *J. Magn. Reson.* 95, 214-220.
- Ghosh, G., Van Duyne, G., Ghosh, S. y Sigler, P. B. (1995) Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site. *Nature* 373, 303-310.
- 65 Gribskov, M., Devereux, J. y Burgess, R. R. (1984) The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nuc. Acids. Res.* 12, 539-549.

- Grimsley, G. R., Shaw, K. L., Fee, L. R., Alston, R. W., Huyghues-Despointes, B. M., Thurlkill, R. L., Scholtz, J. M. y Pace, C. N. (1999) *Protein Sci* 8, 1843-1849.
- Gronebom, A. M., Filpula, D. R., Essig, N. Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P. T. y Clore, G. M. (1991) A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of Streptococcal protein G. *Science* 253, 657-661.
- 5 Gronenbom, A. M. y Clore, G. M. (1993) Identification of the contact surface of a Streptococcal protein G domain complexed with a human Fc fragment. *J. Mol. Biol.* 233, 331-335.
- Grzesiek, S., Anglister, J. y Bax, A. (1993) Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in ¹³C/¹⁵N-enriched proteins by isotropic mixing of ¹³C magnetization. *J. Magn. Reson. B* 101, 114-119.
- 10 Grzesiek, S. y Bax, A. (1992) Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6291-6293.
- Grzesiek, S. y Bax, A. (1993) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *J. Biomol. NMR* 3, 185-204.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- 15 Harpez, Y. y Chothia, C. (1994) Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains *J. Mol. Biol.* 238, 528-539.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J., Bay, M. y Winter, G. (1993) The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. The interaction of mutant D1.3 antibodies with lysozyme. *J. Mol. Biol.* 234, 958-964.
- 20 Hendsch, Z. S., Jonsson, T., Sauer, R. T. y Tidor, B. (1996) *Biochemistry* 35, 7621-7625.
- Hendsch, Z. S. y Tidor, B. (1994) *Protein Sci.* 3,211-226.
- Holliger, P. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6444-6448.
- Hu, S-z., et al., *Cancer Res.* 56:3055-3061 (1996).
- 25 Ikura, M. y Bax, A. (1992) Isotope-filtered 2D NMR of a protein-peptide complex: study of a skeletal muscle myosin light chain kinase fragment bound to calmodulin. *J. Am. Chem. Soc.* 114,2433-2440.
- Ikura, M., Kay, L. E. y Bax, A. (1991) Improved three-dimensional ¹H-¹³C-¹H correlation spectroscopy of a ¹³C-labeled protein using constant-time evolution. *J. Biomol. NMR* 1, 299-304.
- Jacobs, J. y Schultz, P. G. (1987) Catalytic antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2174-2176.
- Johnson, B. A. y Blevins, R. A. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 603-614.
- 30 Janda, K. D., et al., *Science* 275:945-948 (1997).
- Jones, E. Y. (1993) The immunoglobulin superfamily *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3,846-852.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. y Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse *Nature* 321, 522-525.
- 35 Kabsch, W. y Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Kamtekar, S. Schiffer JM, Xiong H, Babik JM, Hecht MH. (1993) Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* 262(5140):1680-1685.
- Kauzmann, W. (1959) *Adv. Prot. Chem.* 14, 1-63.
- 40 Kay, L. E. (1995) Field gradient techniques in NMR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 674-681.
- Kay, L. E., Keifer, P. y Saarinen, T. (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity *Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665.
- Kay, L. E. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2055-2057.
- Kay, L. E., Xu, G.-Y. y Singer, A. U. (1993) A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ¹H and ¹³C Correlations in H₂O Samples of Proteins. *J. Magn. Reson. B* 101, 333-337.
- 45 Koide, S., Bu, Z., Risal, D., Pham, T.-N., Nakagawa, T., Tamura, A. y Engelman, D. M. (1999) *Biochemistry* 38, 4757-4767.
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. y Koide, S. (1998) *J. Mol. Biol.* 284, 1141-1151.
- Koide, S., Dyson, H. J. y Wright, P. E. (1993) Characterization of a folding intermediate of apoplastcyanin trapped by proline isomerization. *Biochemistry* 32, 12299-12310.
- 50 Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pederson, K. y Baralle, F. E. (1985) Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene *EMBO J.* 4, 1755-1759.
- Kraulis, P. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24, 946-950.
- Kuhlman, B., Luisi, D. L., Young, P. y Raleigh, D. P. (1999) *Biochemistry* 38, 4896-4903.
- 55 Kunkel, T. A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492.
- Leahy, D. J., Aukhil, I. y Erickson, H. P. (1996) *Cell* 84, 155-164.
- Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I. y Erickson, H. P. (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein *Science* 258, 987-991.
- 60 Lee, W., Revington, M. J., Arrowsmith, C. y Kay, L. E. (1994) A pulsed field gradient isotope-filtered 3D ¹³C HMQC-NOESY experiment for extracting intermolecular NOE contacts in molecular complexes. *FEBS Lett.* 350, 87-90.
- Lerner, R. A. y Barbas III, C. F., *Acta Chemica Scandinavica*, 50 672-678 (1996).
- Lesk, A. M. y Tramontano, A. (1992) Antibody structure and structural predictions useful in guiding antibody engineering. In *Antibody engineering. A practical guide.* (Borrebaeck, C. A. K., Ed.) Vol. W. H. Freeman y Co., New York.
- 65

- Li, B., Tom, J. Y., Oare, D., Yen, R., Fairbrother, W. J., Wells, J. A. y Cunningham, B. C. (1995) Minimization of a polypeptide hormone *Science* 270, 1657-1660.
- Litvinovich, S. V., Novokhatny, V. V., Brew, S. A. y Inhgam, K. C. (1992) Reversible unfolding of an isolated heparin and DNA binding fragment, the first type III module from fibronectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1119, 57-62.
- 5 Logan, T. M., Olejniczak, E. T., Xu, R. X. y Fesik, S. W. (1992) Side chain and backbone assignments in isotopically labeled proteins from two heteronuclear triple resonance experiments. *FEBS lett.* 314, 413-418.
- Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. y Makhatadze, G. I. (1999) *Biochemistry* 38, 16419-16423.
- Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. y Campbell, I. D. (1992) The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* 71, 671-678.
- 10 Malakauskas, S. M. y Mayo, S. L. (1998) *Nat Struct Biol* 5, 470-475.
- Masat, L., et al., (1994) *PNAS* 91:893-896.
- Martin, F., Toniatti, C., Ciliberto, G., Cortese, R. y Sollazzo, M. (1994) The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. *EMBO J.* 13, 5303-5309.
- Martin, M. T., *Drug Discov. Today*, 1:239-247 (1996).
- 15 McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. y Chiswell, D. J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McConnell, S. J., y Hoess, R. H., *J.Mol. Biol.* 250:460-470 (1995).
- McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Koerner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W. y Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* 35, 9958-9966.
- 20 Metzler, W. J., Leiting, B., Pryor, K., Mueller, L. y Farmer, B. T. I. (1996) The three-dimensional solution structure of the SH2 domain from p55blk kinase. *Biochemistry* 35, 6201-6211.
- Minor, D. L. J. y Kim, P. S. (1994) Measurement of the β -sheet-forming propensities of amino acids. *Nature* 367, 660-663.
- Muhandiram, D. R., Xu, G. Y. y Kay, L. E. (1993) An enhanced-sensitivity pure absorption gradient 4D ^{15}N , ^{13}C -edited NOESY experiment. *J. Biomol. NMR* 3, 463-470.
- 25 Müller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L. y Harrison, S. C. (1995) Structure of the NH-kB p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373, 311-117.
- Myers, J. K., Pace, C. N. y Scholtz, J. M. (1995) *Protein Sci.* 4, 2138-2148.
- Nilges, M., Clore, G. M. y Gronenbom, A. M. (1988) Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations. *FEBS lett.* 229, 317-324.
- 30 Nilges, M., Kuszewski, J. y Brunger, A. T. (1991) in *Computational aspects of the study of biological macromolecules by nuclear magnetic resonance spectroscopy.* (Hoch, J. C., Poulsen, F. M. and Redfield, C., Ed.) Vol. pp. 451-455, Plenum Press, New York.
- 35 O'Neil et al., (1994) in *Techniques in Protein Chemistry V* (Crabb, L., ed.) pp.517-524, Academic Press, San Diego.
- O'Neil, K. T. y Hoess, R. H. (1995) Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 5, 443-449.
- Pace, C. N. y Scholtz, J.M.. (1997) Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein structure. A practical approach* (Creighton, T. E., Ed.) Vol. pp. 299-321, IRL Press, Oxford.
- 40 Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M. y Gajiwala, K. (1996) *Faseb J* 10, 75-83.
- Pace, C. N., Laurents, D. V. y Erickson, R. E. (1992) *Biochemistry* 31, 2728-2734.
- Pannley, S. F. y Smith, G. P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes *Gene* 73, 305-318.
- 45 Pascal, S. M., Muhandiram, D. R., Yamazaki, T., Forman-Kay, J. D. y Kay, L. E. (1994a) Simultaneous acquisition of ^{15}N - and ^{13}C -edited NOE spectra of proteins dissolved in H_2O . *J. Magn. Reson. B* 103, 197-201.
- Pascal, S. M., Singer, A. U., Gish, G., Yamazaki, T., Shoelson, S. E., Pawson, T., Kay, L. E. y Forman-Kay, J. D. (1994b) Nuclear magnetic resonance structure of an SH2 domain of phospholipase C-gI complexed with a high affinity binding peptide. *Cell* 77, 461-472.
- Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. y Schmid, F. X. (2000) *Nat Struct Biol* 7, 380-383.
- 50 Perutz, M. F., Gronenbom, A. M., Clore, G. M., Fogg, J. H. y Shih, D. T. (1985) *J Mol Biol* 183, 491-498.
- Pessi, A., Bianchi, E., Cramer, A., Venturini, S., Tramontano, A. y Sollazzo, M. (1993) A designed metal-binding protein with a novel fold. *Nature* 362, 3678-369.
- Pierschbacher, M. D. y Ruoslahti, E. (1984) *Nature* 309, 30-33.
- Plaxco, K. W., Spitzfaden, C., Campbell, I. D. y Dobson, C. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10703-10706.
- 55 Plaxco, K. W., Spitzfaden, C., Campbell, I. D. y Dobson, C. M. (1997) *J. Mol. Biol.* 270, 763-770.
- Rees, A. R., Staunton, D., Webster, D. M., Searle, S. J., Henry, A. H. y Pedersen, J. T. (1994) Antibody design: beyond the natural limits. *Trends Biotechnol.* 12, 199-206.
- Roberts et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2429-2433.
- Rosenblum, J. S. y Barbas, C. F. I. (1995) in *Antobody Engineering* (Borrenbaeck, C. A. K., Ed.) Vol. pp89-116, Oxford University Press, Oxford.
- 60 Sali, D., Bycroft, M. y Fersht, A. R. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 779-788. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sandhu, G. S., Aleff, R. A. y Kline, B. C. (1992) Dual asymmetric PCR: one-step construction of synthetic genes. *BioTech.* 12, 14-16.
- 65 Santoro, M. M. y Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl a-chymotrypsin using different denaturants *Biochemistry* 27, 8063-8068.

- Smith, G. P. y Scott, J. K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 217, 228-257.
- Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- 5 Smith, C. K., Munson, M. y Regan, L. (1995). Studying α -helix and β -sheet formation in small proteins. *Techniques Prot. Chem.*, 6, 323-332.
- Smith, C. K., Withka, J. M. y Regan, L. (1994) A thermodynamic scale for the β -sheet forming tendencies of the amino acids. *Biochemistry* 33, 5510-5517.
- 10 Smyth, M. L. y von Itzstein, M. (1994) Design and synthesis of a biologically active antibody mimic based on an antibody-antigen crystal structure. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 2725-2733.
- Spector, S., Wang, M., Carp, S. A., Robblee, J., Hendsch, Z. S., Fairman, R., Tidor, B. y Raleigh, D. P. (2000) *Biochemistry* 39, 872-879.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. y Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
- 15 Suzuki, H. (1994) Recent advances in antibody studies. *J. Biochem.* 115, 623-628.
- Tello, D., Goldbaum, F. A., Mariuzza, R. A., Ysem, X., Schwarz, F. P. y Poljak, R. J. (1993) Immunoglobulin superfamily interactions. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 943-946.
- Thomas, N. R. (1994) Hapten design for the generation of catalytic antibodies. *Appl. Biochem. Biotech.* 47, 345-372.
- 20 Timasheff, S. N. (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2, 35-39.
- Verhoeyen, M., Milstein, C. y Winter, G. (1988) Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity. *Science* 239, 1534-1536.
- Venturini et al., (1994) *Protein Peptide Letters* 1, 70-75.
- Vuister, G. W. y Bax, A. (1992) Resolution enhancement and spectral editing of uniformly ^{13}C -enriched proteins by homonuclear broadband ^{13}C decoupling. *J. Magn. Reson.* 98, 428-435.
- 25 Vuister, G. W., Clore, G. M., Gronenbom, A. M., Powers, R., Garrett, D. S., Tschudin, R. y Bax, A. (1993) Increased resolution and improved spectral quality in four-dimensional $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -separated HMQC-NOESY-HMQC spectra using pulsed field gradients. *J. Magn. Reson. B* 101, 210-213.
- Ward, E. S., Güssow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T. y Winter, G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli* *Nature* 341, 554-546.
- 30 Webster, D. M., Henry, A. H. y Rees, A. R. (1994) Antibody-antigen interactions *Curr. Opinion Struct. Biol.* 4, 123-129.
- Williams, A. F. y Barclay, A. N., *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405 (1988).
- Wilson, I. A. y Stanfield, R. L. (1993) Antibody-antigen interactions. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 3, 113-118.
- Wilson, I. A. y Stanfield, R. L. (1994) Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes *Curr. Opinion Struct. Biol.* 4, 857-867.
- 35 Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. y Hoogenboom, H. R. (1994) Making antibodies by phage display technology *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. y Lin, L.-N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131-137.
- 40 Wittenkind, M. y Mueller, L. (1993) HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the α - and β -carbon resonances in proteins *J. Magn. Reson. B* 101, 201-205.
- Wu, T. T., Johnson, G. y Kabat, E. A. (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 16, 1-7.
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley y Sons, New York.
- 45 Yamazaki, T., Forman-Kay, J. D. y Kay, L. E. (1993) Two-Dimensional NMR Experiments for Correlating ^{13}C - β and ^1H - δ/ϵ Chemical Shifts of Aromatic Residues in ^{13}C -Labeled Proteins via Scalar Couplings. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11054.
- Yang, A.-S. y Honig, B. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2,40-45.
- 50 Zhang, O., Kay, L. E., Olivier, J. P. y Forman-Kay, J. D. (1994) Backbone ^1H and ^{15}N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *J. Biomol. NMR* 4, 845-858.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> Research Corporation Technologies, Inc.
- Koide, Shohei
- <120> POLIPÉPTIDOS DE ANTICUERPOS ARTIFICIALES
- 60 <130> 109.050WO1
- <150> US 60/217.474
<151> 11-07-2000
- 65 <160> 121

ES 2 564 161 T3

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

5 <210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> Anticuerpo anti lisozima de huevo de gallina (HEL)
 <400> 1

Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5 10

15 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Un dominio anti VH sencillo de HEL denominado VH8.
 <400> 2

Ala Arg Gly Ala Val Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15
Gly

25 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
1 5 10 15

35 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Mutante D1.3-1.
 <400> 4

45 **Tyr Ala Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Pro Ile**
1 5 10

50 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Mutante D1.3-2.

<400> 5

Tyr Ala Val Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Pro Ile
1 5 10

5 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Mutante D1.3-3.

<400> 6

5Tyr Ala Val Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Ala Ser Ser Lys Pro Ile
1 5 10 15

15 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Mutante D1.3-4.

25 <400> 7

Tyr Ala Val Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Lys Pro Ile
1 5 10

30 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Mutante D1.3-5.

<400> 8

Tyr Ala Val Arg Asp Tyr Arg Ser Lys Pro Ile
1 5 10

40 <210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Mutante D1.3-6.

40<400> 9

50 **Tyr Ala Val Thr Arg Asp Tyr Arg Leu Ser Ser Lys Pro Ile**
1 5 10

55 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 564 161 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutante D1.3-7.

5

<400> 10

Tyr Ala Val Thr Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Ser Ser Lys Pro Ile
1 5 10 15

10

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Mutante VH8-1.

<400> 11

Tyr Ala Val Ala Val Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Pro Ile
1 5 10 15

20

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutante VH8-2.

30

<400> 12

Tyr Ala Val Thr Ala Val Val Ser Tyr Tyr Ala Ser Ser Lys Pro Ile
1 5 10 15

35

<210> 13

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Oligonucleótido FN1F.

<400> 13

cgggatcca tatgcagggt tctgatgttc cgcgtgacct ggaagttgtt gctgcgacc 59

45

<210> 14

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Oligonucleótido FN1R.

<400> 14

taactgcagg agcatcccag ctgatcagca ggctagtcgg ggctgcagca acaac 55

55

<210> 15

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 564 161 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido FN2F.

 <400> 15
 5 ctctgcagct taccgtgcgt tattaccgta tcacgtacgg tgaaccggg g 51

 <210> 16
 <211> 39
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido FN2R.

 <400> 16
 15 gtgaattcct gaaccgggga gttaccaccg gtttcaccg 39

 <210> 17
 <211> 46
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido FN3F.

 <400> 17
 25 aggaattcac tgtacctgg tccaagtcta ctgctacat cagcgg 46

 <210> 18
 <211> 38
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido FN3R.

 <400> 18
 35 gtatagtcga caccgggtt caggccgctg atggtagc 38

 <210> 19
 <211> 32
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido FN4F.

 <400> 19
 50 cgggtgtcga ctataccatc actgtatagc ct 32

 <210> 20
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido FN4R.

 <400> 20
 60 cgggatccga gctcgtggg ctgtcaccac ggccagtaac agcgtataca gtgat 55

 <210> 21
 <211> 35
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido FN5F.

 <400> 21
 5 cagcgagctc caagccaatc tcgattaact accgt 35

 <210> 22
 <211> 37
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido FN5R.

 <400> 22
 15 cgggatcctc gagttactag gtacggtagt taatcga 37

 <210> 23
 <211> 38
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido FN5R'.

 <400> 23
 25 cgggatccac gcgtgccacc ggtacggtag ttaatcga 38

 <210> 24
 <211> 44
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido gen 3F.

 <400> 24
 35 cgggatccac gctccattc gtttgaat atcaaggcca atcg 44

 <210> 25
 <211> 39
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido gen 3R.

 <400> 25
 50 ccggaagctt taagactcct tattacgcag tatgttagc 39

 <210> 26
 <211> 36
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido 38TAABg1II.

 <400> 26
 60 ctgttactgg ccgtgagatc taaccagcga gctcca 36

 <210> 27
 <211> 51
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 564 161 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido BC3.
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(51)
 5 <223> n = A, T, C o G

 <400> 27
 gatcagctgg gatgctcctn nknnknnknn knnktattac cgtatcacgt a 51

 10 <210> 28
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido FG2.
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(57)
 20 <223> n = A, T, C o G

 <400> 28
 tgatcacgct gttactggcn nknnknnknn knnknknknk tccaagccaa tctcga t 57

 25 <210> 29
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido FG3.
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(47)
 <223> n = A, T, C o G

 35 <400> 29
 ctgtatcacgc tggactggc nnknknknkn nkccagcgag ctccaag 47

 40 <210> 30
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Oligonucleótido FG4.
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(51)
 <223> n = A, T, C o G

 50 <400> 30
 catcactgta tacgctgta ctnknknkn knnknknkcc aagccaatct c 51

 55 <210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 211 de unión a ubiquitina

 <400> 31

Cys Ala Arg Arg Ala
1 5

 <210> 32
 <211> 7

ES 2 564 161 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 211 de unión a ubiquitina

<400> 32

Arg Trp Ile Pro Leu Ala Lys
1 5

10 <210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 212 de unión a ubiquitina

<400> 33

Cys Trp Arg Arg Ala
1 5

20 <210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 212 de unión a ubiquitina

<400> 34

Arg Trp Val Gly Leu Ala Trp
1 5

30 <210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 213 de unión a ubiquitina

<400> 35

Cys Lys His Arg Arg
1 5

40 <210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 213 de unión a ubiquitina

<400> 36

Phe Ala Asp Leu Trp Trp Arg
1 5

50 <210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 564 161 T3

<223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 214 de unión a ubiquitina

<400> 37

Cys Arg Arg Gly Arg

1

5

5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 214 de unión a ubiquitina

<400> 38

Arg Gly Phe Met Trp Leu Ser

1

5

20

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 215 de unión a ubiquitina.

25

<400> 39

Cys Asn Trp Arg Arg

1

5

30

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 215 de unión a ubiquitina.

35

<400> 40

Arg Ala Tyr Arg Tyr Arg Trp

1

5

40

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 411 de unión a ubiquitina

45

<400> 41

Ser Arg Leu Arg Arg

1

5

50

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

ES 2 564 161 T3

<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 411 de unión a ubiquitina

<400> 42

Pro Pro Trp Arg Val

1 5

5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 422 de unión a ubiquitina

<400> 43

Ala Arg Trp Thr Leu

1 5

15

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 422 de unión a ubiquitina

<400> 44

Arg Arg Trp Trp Trp

1 5

25

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon monocuerpo 424 de unión a ubiquitina

<400> 45

Gly Gln Arg Thr Phe

1 5

35

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon monocuerpo 424 de unión a ubiquitina

<400> 46

Arg Arg Trp Trp Ala

1 5

45

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

50

<220>
<223> La secuencia del bucle BC de TN de la biblioteca n.º 2.

<400> 47

Ala Val Thr Val Arg

1 . 5

5 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del TN de la biblioteca n.º 2.

10 <400> 48

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser

1 . 5

15 <210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.1.

20 <400> 49

Cys Asn Trp Arg Arg

1 . 5

25 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.1.

<400> 50

Arg Ala Tyr Arg Tyr Arg Trp

1 . 5

35 <210> 51
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.2.

<400> 51

Cys Met Trp Arg Ala

1 . 5

45 <210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.2.

<400> 52

ES 2 564 161 T3

Arg Trp Gly Met Leu Arg Arg

1 5

<210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.3.

10

<400> 53

Ala Arg Met Arg Glu

1 5

<210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.3.

20

<400> 54

Arg Trp Leu Arg Gly Arg Tyr

1 5

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> QSecuencia artificial

25

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.4.

30

<400> 55

Cys Ala Arg Arg Arg

1 5

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.4.

40

<400> 56

Arg Arg Ala Gly Trp Gly Trp

1 5

<210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.5.

50

<400> 57

Cys Asn Trp Arg Arg

1 5

<210> 58
 <211> 7

ES 2 564 161 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.5.

<400> 58

. Arg Ala Tyr Arg Tyr Arg Trp
1 5

10 <210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.6.

<400> 59

Arg Trp Arg Glu Arg
1 5

20 <210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.6.

<400> 60

Arg His Pro Trp Thr Glu Arg
1 5

30 <210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.7.

40 <400> 61

Cys Asn Trp Arg Arg
1 5

45 <210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.7.

<400> 62

Arg Ala Tyr Arg Tyr Arg Trp
1 5

55 <210> 63
<211> 5

ES 2 564 161 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.8.

<400> 63

Glu Arg Arg Val Pro
1 5

10 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.8.

<400> 64

Arg Leu Leu Leu Trp Gln Arg
1 5

20 <210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.9.

<400> 65

Gly Arg Gly Ala Gly
1 5

30 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.9.

<400> 66

Phe Gly Ser Phe Glu Arg Arg
1 5

40 <210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.11.

<400> 67

Cys Arg Trp Thr Arg
1 5

50 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 564 161 T3

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.11.

<400> 68

Arg Arg Trp Phe Asp Gly Ala

1 . 5

5

<210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB24.12.

<400> 69

Cys Asn Trp Arg Arg

1 . 5

15

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB24.12.

<400> 70

Arg Ala Tyr Arg Tyr Arg Trp

1 . 5

25

<210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC de TN de la biblioteca n.º 4.

<400> 71

Ala Val Thr Val Arg

1 . 5

35

<210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Desconocido

40

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG de TN de la biblioteca n.º 4.

<400> 72

Gly Arg Gly Asp Ser

1 . 5

45

<210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB25.1.

<400> 73

ES 2 564 161 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon pLB25.4.

5
<400> 79

Leu Arg Tyr Arg Ser

1 5

<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon pLB25.4.

15
<400> 80

Gly Trp Arg Trp Arg

1 5

<210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon pLB25.5.

25
<400> 81

Gly Gln Arg Thr Phe

1 5

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon pLB25.5.

35
<400> 82

Arg Arg Trp Trp Ala

1 5

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> La secuencia del bucle BC del clon pLB25.6.

45
<400> 83

Gly Gln Arg Thr Phe

1 5

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> La secuencia del bucle FG del clon pLB25.6.

55

ES 2 564 161 T3

<400> 84

Arg Arg Trp Trp Ala

1 5

<210> 85
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB25.7.

10

<400> 85

Leu Arg Tyr Arg Ser

1 5

<210> 86
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB25.7.

20

<400> 86

Gly Trp Arg Trp Arg

1 5

<210> 87
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB25.9.

30

<400> 87

Leu Arg Tyr Arg Ser

1 5

<210> 88
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon pLB25.9.

40

<400> 88

Gly Trp Arg Trp Arg

1 5

<210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon pLB25.11.

50

<400> 89

Gly Gln Arg Thr Phe

1 5

ES 2 564 161 T3

<223> La secuencia del bucle FG de TN de la Tabla 7.

<400> 95
 ggccgtggtg acagcccagc gagc 24

5

<210> 96
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Desconocido

10

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG de TN de la Tabla 7.

<400> 96

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser

1 5

15

<210> 97
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon 1 de la Tabla 7.

<400> 97
 tcgaggttgc ggcgg 15

25

<210> 98
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon 1 de la Tabla 7.

35

<400> 98

Ser Arg Leu Arg Arg

1 5

<210> 99
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon 1 de la Tabla 7.

<400> 99
 ccgccgtgga ggggtg 15

45

<210> 100
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon 1 de la Tabla 7.

55

<400> 100

Pro Pro Trp Arg Val

1 . 5

<210> 101

ES 2 564 161 T3

<211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon 2 de la Tabla 7.

<400> 101
 ggtcagcgaa ctttt 15

10

<210> 102
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon 2 de la Tabla 7.

<400> 102

Gly	Gln	Arg	Thr	Phe
1				5

20

<210> 103
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon 2 de la Tabla 7.

<400> 103
 aggcggtggt gggct 15

30

<210> 104
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon 2 de la Tabla 7.

40

<400> 104

Arg	Arg	Trp	Trp	Ala
1				5

<210> 105
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon 3 de la Tabla 7.

<400> 105
 gcgaggtgga cgctt 15

50

<210> 106
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> La secuencia del bucle BC del clon 3 de la Tabla 7.

60

<400> 106

Ala Arg Trp Thr Leu

1 5

5 <210> 107
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon 3 de la Tabla 7.

10 <400> 107
 aggcggtggt ggtgg 15

15 <210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> La secuencia del bucle FG del clon 3 de la Tabla 7.

<400> 108

Arg Arg Trp Trp Trp

1 5

25 <210> 109
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Una cola de solubilidad.

<400> 109

Gly Lys Lys Gly Lys

1 5

35 <210> 110
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> El gen Fn3 sintético.

<400> 110

Met	Gln	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr
1				5					10					15	
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg
			20					25					30		
Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln
		35					40					45			
5Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
	50					55					60				
Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
65					70					75				80	
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr
				85					90					95	

ES 2 564 161 T3

<210> 111
 <211> 308
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> El gen denominado Fn3.

<400> 111

```

catatgcagg tttctgatgt tccgcgtgac ctggaagttg ttgctgcgac cccgactage      60
ctgctgatca gctgggatgc tcctgcagtt accgtgcggt attaccgtat cacgtacggg      120
gaaaccggtg gtaactcccc ggttcaggaa ttcactgtac ctggttccaa gtctactgct      180
accatcagcg gcctgaaacc ggggtgctgac tataccatca ctgtatacgc tgttactggc      240
cgtgggtgaca gcccagcgag ctccaagcca atctcgatta actaccgtac ctagtaactc      300
gaggatcc                                     308
    
```

10

<210> 112
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> El gen denominado Fn3.

20

<400> 112

```

Met Gln Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1          5          10          15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
20          25          30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35          40          45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50          55          60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
65          70          75          80
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85          90          95
    
```

<210> 113

25

<400> 113
 000

<210> 114
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Una proteína de fusión

35

<400> 114

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His
20

5 <210> 115
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Una secuencia del clon Plb25.1.

10 <400> 115

Gly Gln Arg Thr Phe Arg Arg Trp Trp Ala
1 5 10

15 <210> 116
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Una secuencia del clon Plb25.4.

20 <400> 116

Leu Arg Tyr Arg Ser Gly Trp Arg Trp Arg
1 5 10

25 <210> 117
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Una secuencia del clon pLB24.1.

30 <400> 117

Cys Asn Trp Arg Arg Arg Ala Tyr Arg Tyr Trp Arg
1 5 10

35 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Una secuencia del clon pLB24.3.

40 <400> 118

Ala Arg Met Arg Glu Arg Trp Leu Arg Gly Arg Tyr
1 5 10

45 <210> 119
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 119
 Glu Ile Asp Lys

ES 2 564 161 T3

<210> 120
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> Anticuerpo anti lisozima de huevo de gallina (HEL).

<400> 120

Arg Asp Tyr Arg

1

10

<210> 121
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 121

```

Met Gln Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
65 70 75 80
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
    
```


REIVINDICACIONES

1. Un monocuerpo polipeptídico de fibronectina de tipo III (Fn3) que comprende una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle, en el que una o más secuencias de la región bucle del monocuerpo varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural;
- 5 en el que el monocuerpo polipeptídico Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el que dicha mutación estabilizante aumenta el punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.
- 10
- 15 2. El monocuerpo de la reivindicación 1, en el que el resto correspondiente a Asp 7, Glu9 o Asp23 se ha sustituido por un resto de asparagina o de lisina.
3. El monocuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que la Asp 7 o Asp 23, o ambas, se han sustituido por un resto de asparagina (Asn) o de lisina (Lys).
- 20 4. El monocuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que el Glu9 se ha sustituido por un resto de Asn o de Lys.
5. El monocuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos una región bucle puede unirse a un compañero de unión específico (SBP) para formar un complejo polipéptido:SBP que tiene una constante de disociación de menos de 10^{-6} moles/litro.
- 25 6. El monocuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las regiones bucle correspondientes en el Fn3 natural comprenden los restos de aminoácidos:
- 30 i) desde el 15 al 16 inclusive en un bucle AB;
 ii) desde el 22 al 30 inclusive en un bucle BC;
 iii) desde el 39 al 45 inclusive en un bucle CD;
 iv) desde el 51 al 55 inclusive en un bucle DE;
 v) desde el 60 al 66 inclusive en un bucle EF; y
 35 vi) desde el 76 al 87 inclusive en un bucle FG.
7. El monocuerpo de la reivindicación 6, en la que las secuencias de la región bucle del monocuerpo varían de las secuencias de la región bucle de Fn3 natural mediante la delección o sustitución de al menos 2 aminoácidos.
- 40 8. El monocuerpo de la reivindicación 6, en el que las secuencias de la región bucle del monocuerpo varían de las secuencias de la región bucle de Fn3 natural mediante la inserción de entre 3 a 25 aminoácidos.
9. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el monocuerpo Fn3 de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-8.
- 45 10. Un vector de expresión que comprende un casete de expresión unido operativamente a la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 50 11. Una célula hospedadora transformada con el vector de la reivindicación 10.
12. Un método para preparar un monocuerpo polipeptídico de fibronectina de tipo III (Fn3) que comprende las etapas de:
- 55 (a) proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que se unen a una pluralidad de secuencias de la región bucle;
 (b) preparar cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) suficientemente complementarios con una secuencia bucle con el fin de ser hibridables en las condiciones de la PCR, en el que al menos uno de los cebadores contiene una secuencia de ácido nucleico que se va a insertar en el ADN;
 (c) llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa utilizando la secuencia de ADN de (a) y los cebadores de (b);
 60 (d) hibridar y extender los productos de reacción de (c) con el fin de dar como resultado un producto de ADN; y
 (e) expresar el monocuerpo polipeptídico codificado por el producto de ADN de (d)
 en el que el monocuerpo polipeptídico Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el
- 65

que dicha mutación estabilizante aumenta el punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.

5 13. Un método para preparar un monocuerpo polipeptídico de fibronectina de tipo III (Fn3) que comprende las etapas de:

- 10 a) proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que se unen a una pluralidad de secuencias de la región bucle;
 b) llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio de al menos una región bucle con el fin de crear una secuencia de ADN que comprende una mutación de inserción; y
 15 c) expresar el monocuerpo polipeptídico codificado por la secuencia de ADN que comprende la mutación de inserción;

15 en el que el monocuerpo polipeptídico Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el que dicha mutación estabilizante aumenta el punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.

20 14. Una biblioteca de ácidos nucleicos variada que codifica monocuerpos de los polipéptidos Fn3 que comprenden una pluralidad de especies de ácidos nucleicos comprendiendo cada una de ellas una pluralidad de regiones bucle, en la que las especies codifican una pluralidad de secuencias del dominio de la hebra β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la región bucle,

25 en la que una o más de las secuencias de la región bucle varían mediante la delección, la inserción o la sustitución de al menos dos aminoácidos procedentes de secuencias correspondientes de la región bucle en Fn3 natural;

30 en el que el monocuerpo polipeptídico Fn3 comprende una mutación estabilizante de al menos un resto de aminoácido en comparación con una molécula de Fn3 natural, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos un resto de aminoácido que está implicado en una interacción electrostática desfavorable, en el que la mutación estabilizante es una sustitución de al menos una Asp 7, Asp23 o Glu 9 por otro resto de aminoácido, en el que dicha mutación estabilizante aumenta el punto de fusión del monocuerpo polipeptídico Fn3 en más de 0,1 °C en comparación con un monocuerpo polipeptídico Fn3 que es idéntico excepto por el cambio.

35 15. La biblioteca de ácido nucleico variada de la reivindicación 14, en la que una o más de las regiones bucle codifica:

- 40 i) un bucle de aminoácido AB desde el resto 15 al 16 inclusive;
 ii) un bucle de aminoácido BC desde el resto 22 al 30 inclusive;
 iii) un bucle de aminoácido CD desde el resto 39 a 45 inclusive;
 iv) un bucle de aminoácido DE desde el resto 51 a 55 inclusive;
 v) un bucle de aminoácido EF desde el resto 60 a 66 inclusive; y
 vi) un bucle de aminoácido FG desde el resto 76 a 87 inclusive.

45 16. La biblioteca de ácido nucleico variada de la reivindicación 14 o 15, en la que las secuencias de la región bucle varían de las secuencias de la región bucle de Fn3 natural mediante la delección o sustitución de al menos 2 aminoácidos.

50 17. La biblioteca de ácido nucleico variada de la reivindicación 14 o 15, en el que las secuencias de la región bucle del monocuerpo varían de las secuencias de la región bucle de Fn3 natural mediante la inserción de entre 3 a 25 aminoácidos.

55 18. La biblioteca de ácido nucleico variada de cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en la que una secuencia de ácido nucleico variada que comprende de 6 a 75 bases de ácidos nucleicos se inserta en una cualquiera de las regiones bucle de las especies.

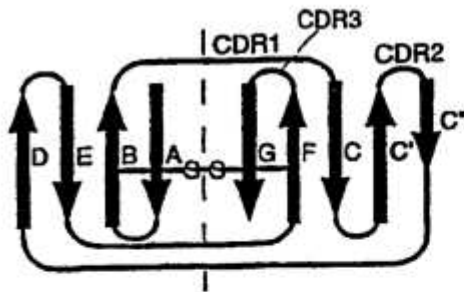
19. La biblioteca de ácido nucleico variada de una cualquiera de la reivindicación 14-18, en la que la secuencia variada se construye para evitar uno o más codones seleccionados entre el grupo que consiste en codones que codifican cisteína y el codón de detención.

60 20. La biblioteca de ácido nucleico variada de la reivindicación 15, en la que la secuencia de ácido nucleico variada está localizada en el bucle BC.

65 21. La biblioteca de ácido nucleico variada de la reivindicación 15, en la que la secuencia de ácido nucleico variada está localizada en el bucle DE.

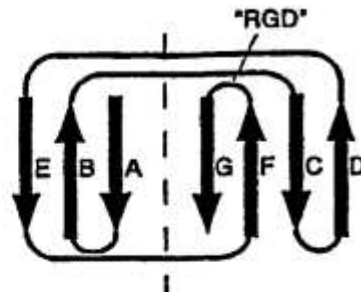
22. La biblioteca de ácido nucleico variada de la reivindicación 15, en la que la secuencia de ácido nucleico variada está localizada en el bucle FG.
- 5 23. Una biblioteca de expresión de péptidos generada utilizando la biblioteca de ácido nucleico variada de cualquiera de las reivindicaciones 14-22.
24. La biblioteca de expresión de péptidos de la reivindicación 23, en la que el péptido se expresa sobre la superficie de un bacteriófago o virus.
- 10 25. La biblioteca de expresión de péptidos de la reivindicación 24, en la que el bacteriófago es M13 o fd.
26. Un método para identificar la secuencia de aminoácidos de una molécula de polipéptido que se une a un compañero de unión específico (SBP) con el fin de formar un complejo polipéptido:SBP en el que la constante de disociación del complejo polipéptido:SBP es menor de 10^{-6} moles/litro, que comprende las etapas de:
- 15 a) proporcionar una biblioteca de expresión de péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23-25;
- b) poner en contacto la biblioteca de expresión de péptidos de (a) con un SBP inmovilizado o separable;
- 20 c) separar los complejos péptido:SBP de los péptidos libres,
- d) producir la replicación de los péptidos separados de (c) para dar como resultado una nueva biblioteca de expresión de péptidos que se distingue de la citada en (a) por tener una diversidad disminuida y por estar enriquecida en péptidos expresados que se unen al SBP;
- e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c), y (d) con la nueva biblioteca de (d); y
- 25 f) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica el péptido expresado de una especie de (d) y deducir la secuencia peptídica que se une al SBP.

FIG. 1A



Immunoglobulina VH

FIG. 1B



Fibronectina tipo III

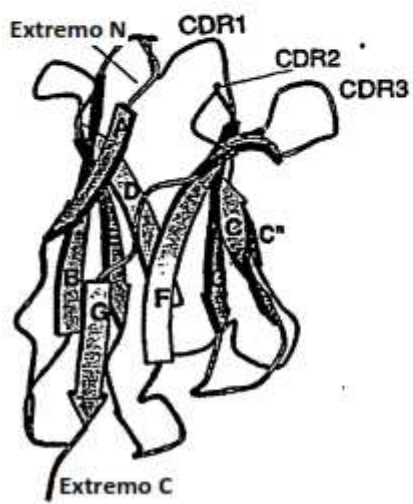


FIG. 1C

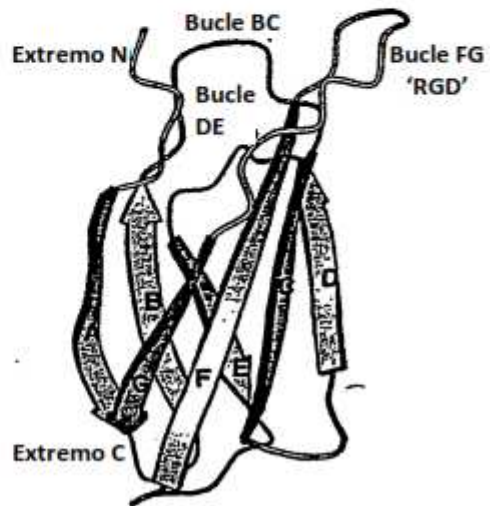


FIG. 1D

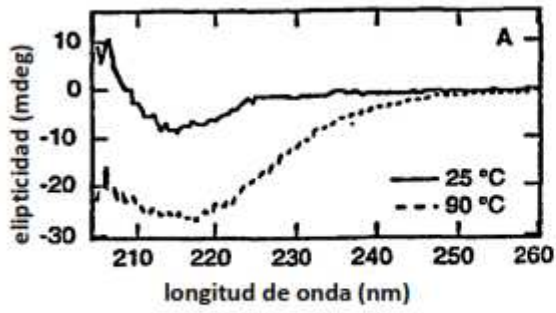


FIG. 3A

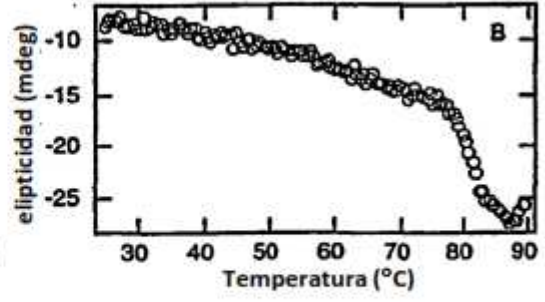


FIG. 3B

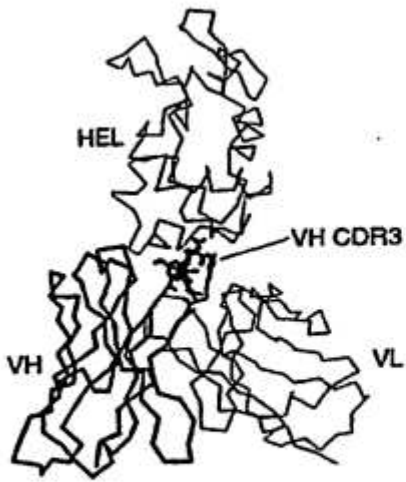


FIG. 4A

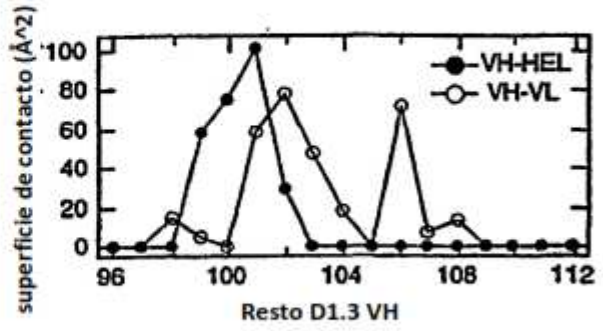


FIG. 4B

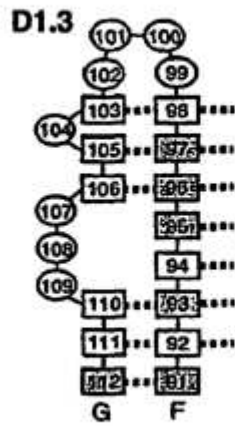


FIG. 4C



FIG. 4D

NdeI
 CATATGCAGGTTTCTGATGTTCCGCGTGACCTGGAAGTTGTTGCTGCGACCCCGACTAGC
 MetGlnValSerAspValProArgAspLeuGluValValAlaAlaThrProThrSer
 -2 -1 1 10

BclI PvuII PstI BsiWI
 CTGCTGATCAGCTGGGATGCTCCTGCAGTTACCGTGCGTTATTACCGTATCACGTACGGT
 LeuLeuIleSerTrpAspAlaProAlaValThrValArgTyrTyrArgIleThrTyrGly
 20 30

EcoRI
 GAAACCGGTGGTAACTCCCCGGTTCAGGAATCACTGTACCTGGTTCCAAGTCTACTGCT
 GluThrGlyGlyAsnSerProValGlnGluPheThrValProGlySerLysSerThrAla
 40 50

SalI Bst1107I
 ACCATCAGCGCCTGAAACCGGGTGTGCGACTATACCATCACTGTATACGCTGTTACTGGC
 ThrIleSerGlyLeuLysProGlyValAspTyrThrIleThrValTyrAlaValThrGly
 60 70

SacI XhoI
 CGTGGTGACAGCCAGCGAGCTCCAAGCCAATCTCGATTAACTACCGTACCTAGTAACTC
 ArgGlyAspSerProAlaSerSerLysProIleSerIleAsnTyrArgThr
 80 90

FIG. 5

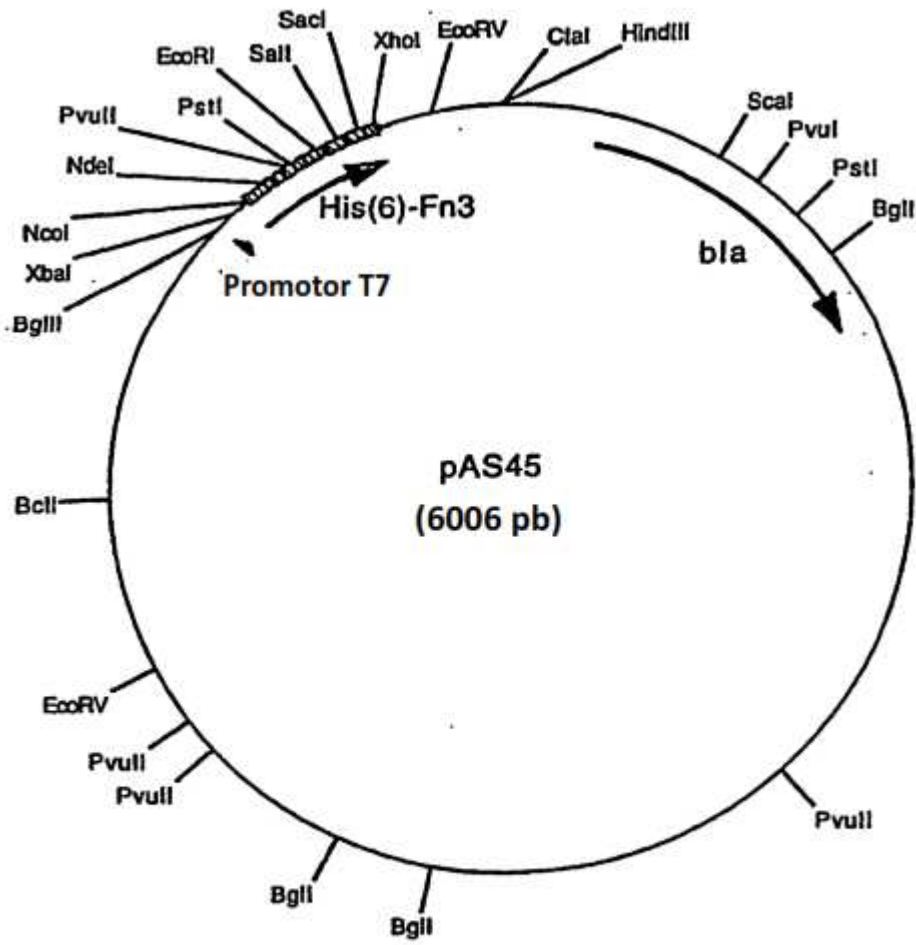


FIG. 6

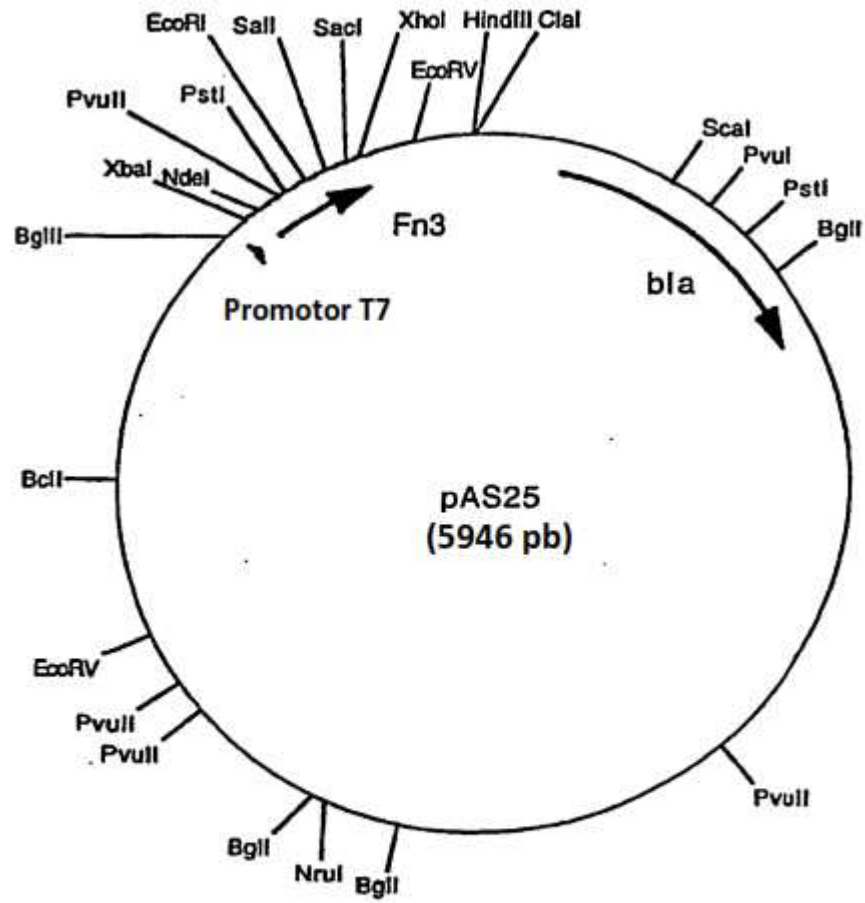


FIG. 7

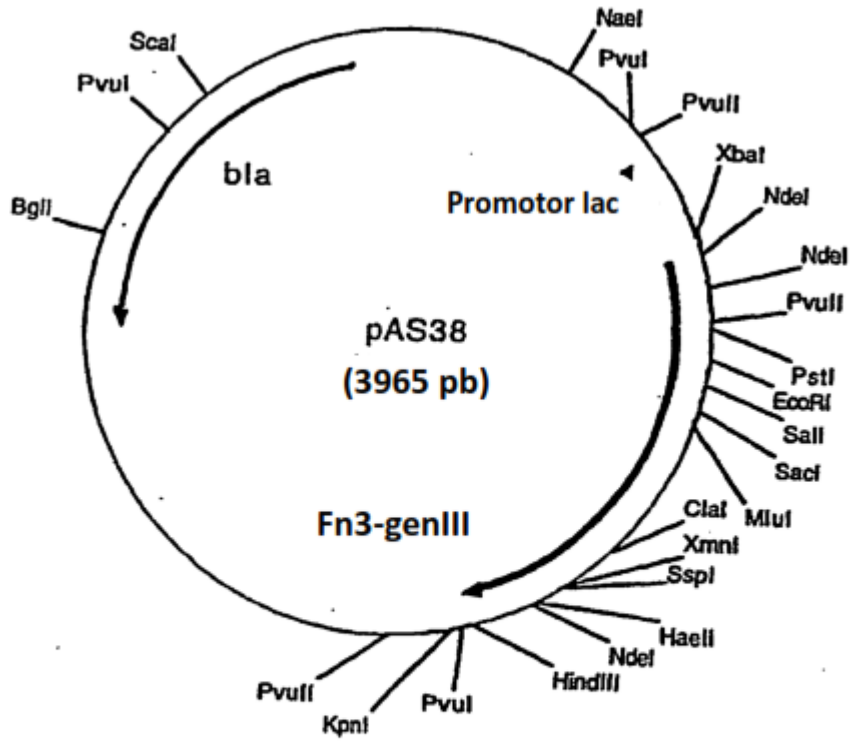


FIG. 8

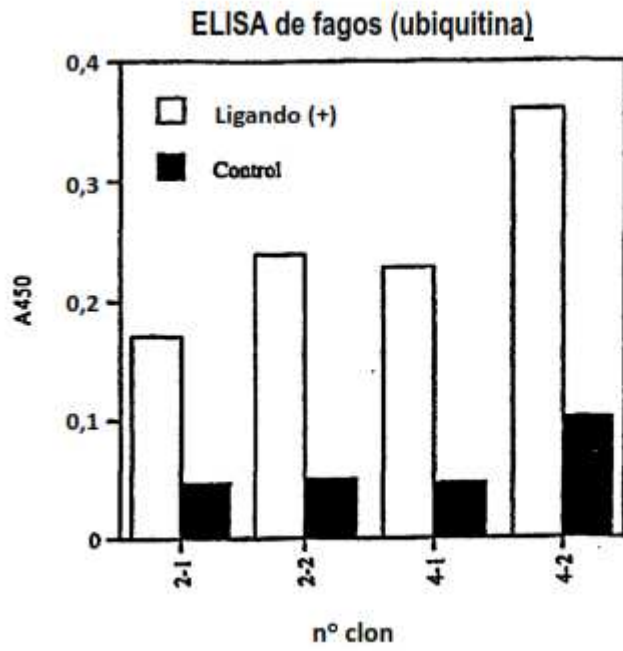


FIG. 9

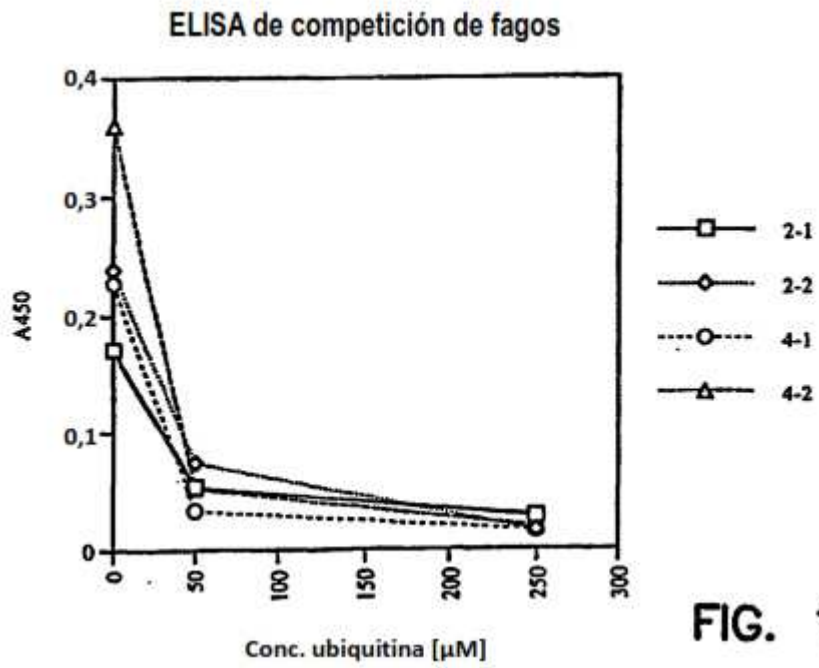


FIG. 10

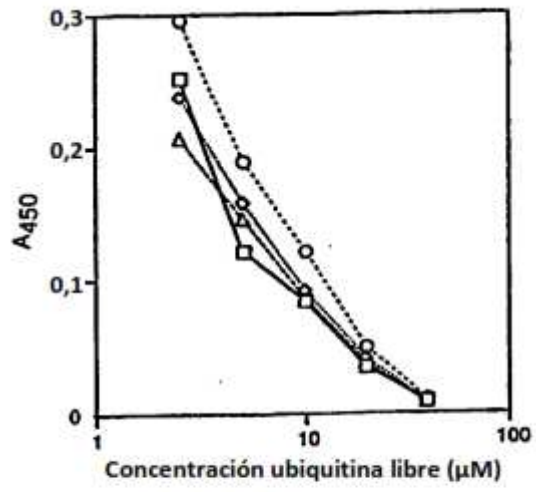


FIG. 11

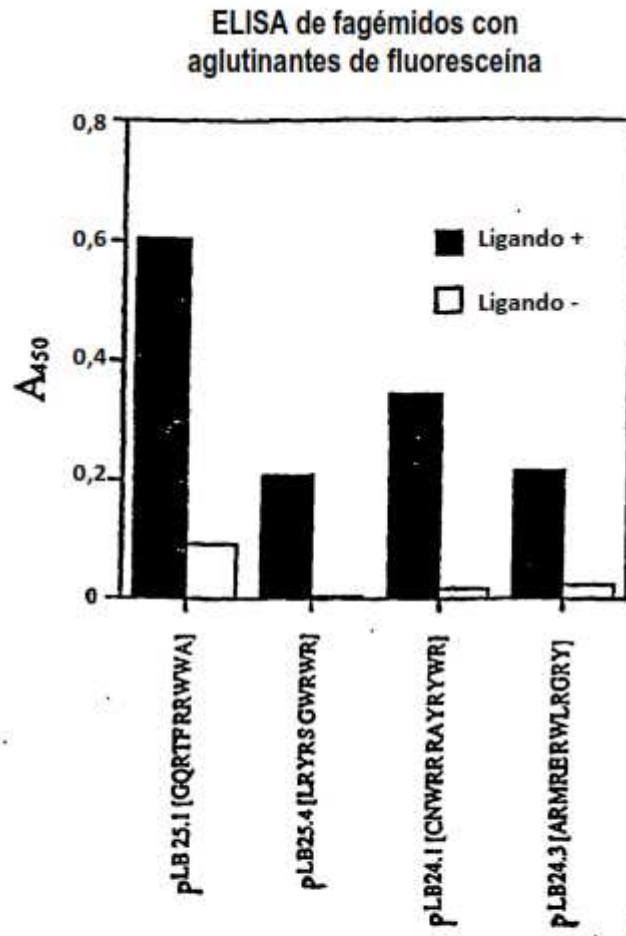


FIG. 12

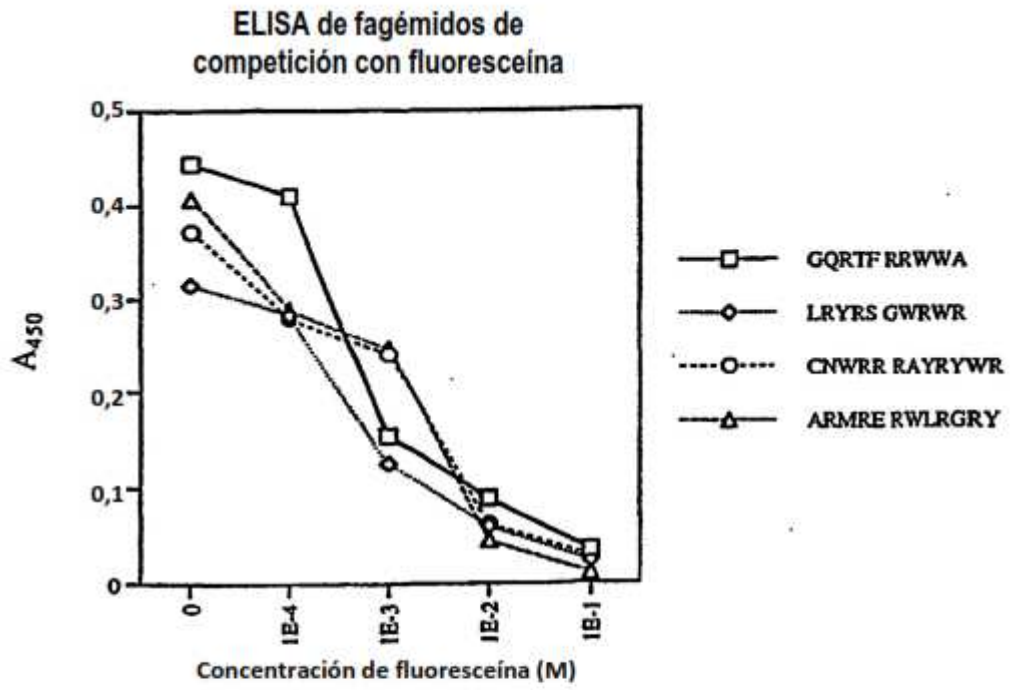


FIG. 13

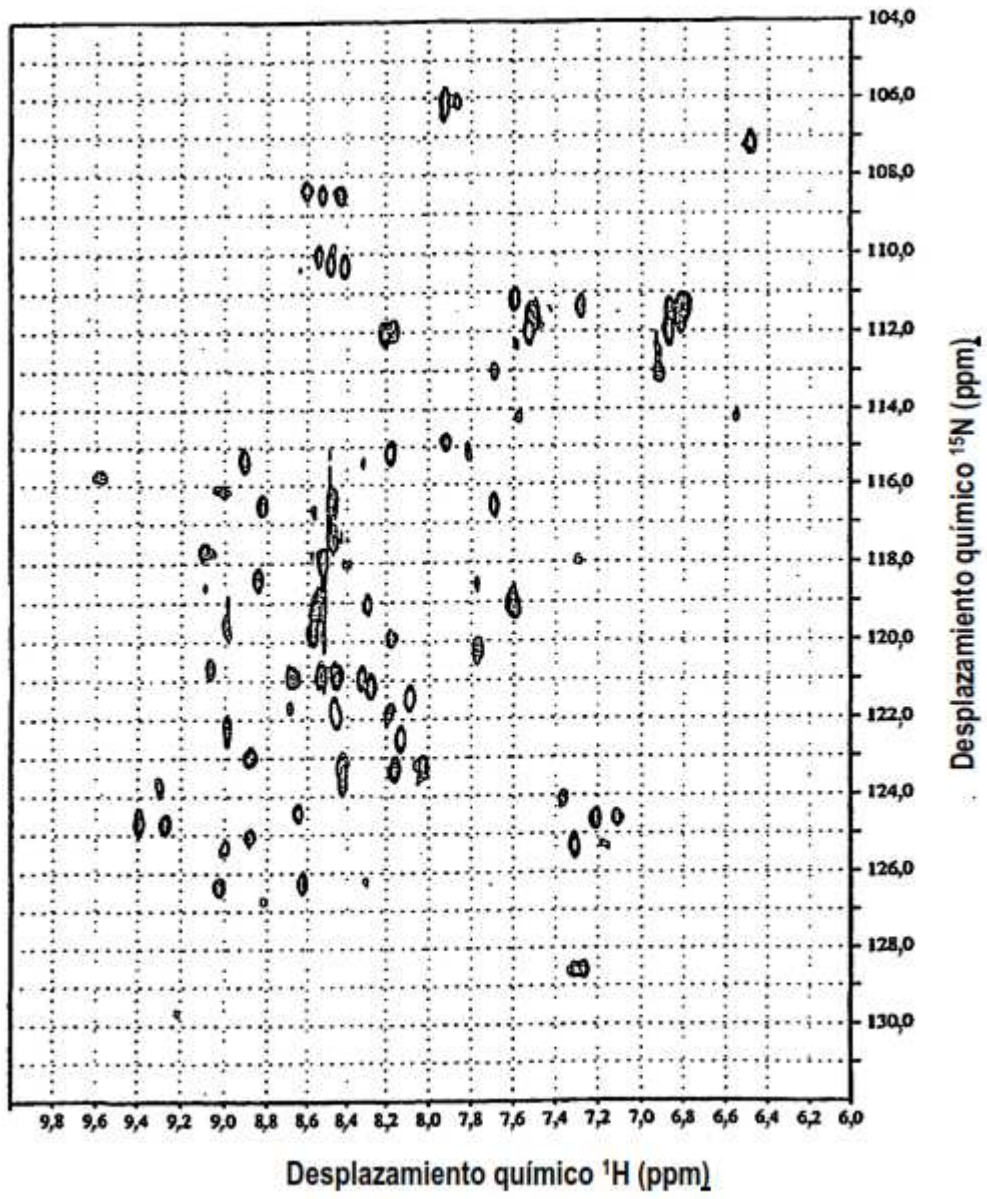


FIG. 14

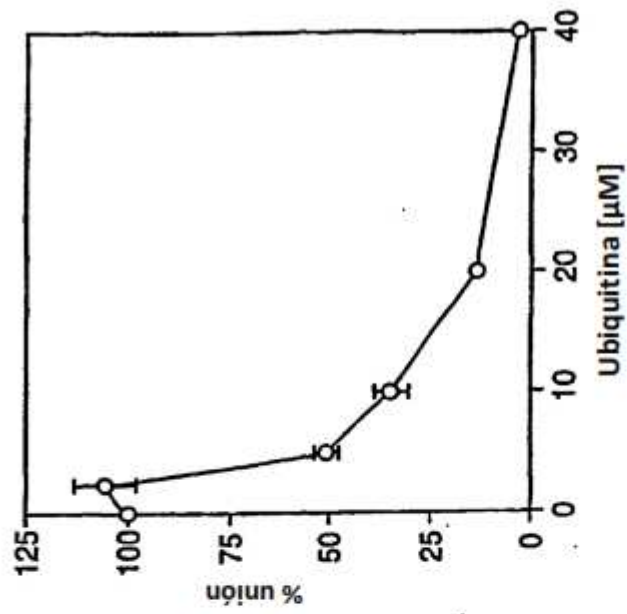


FIG. 15B

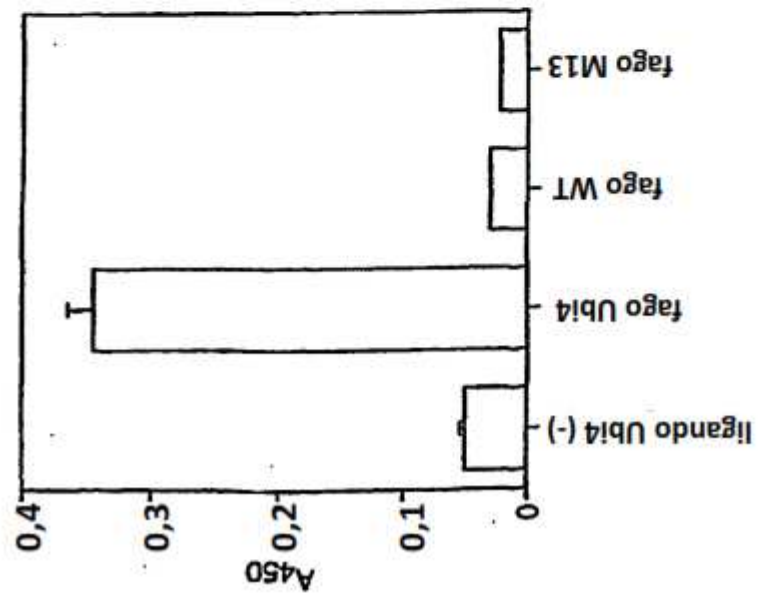


FIG. 15A

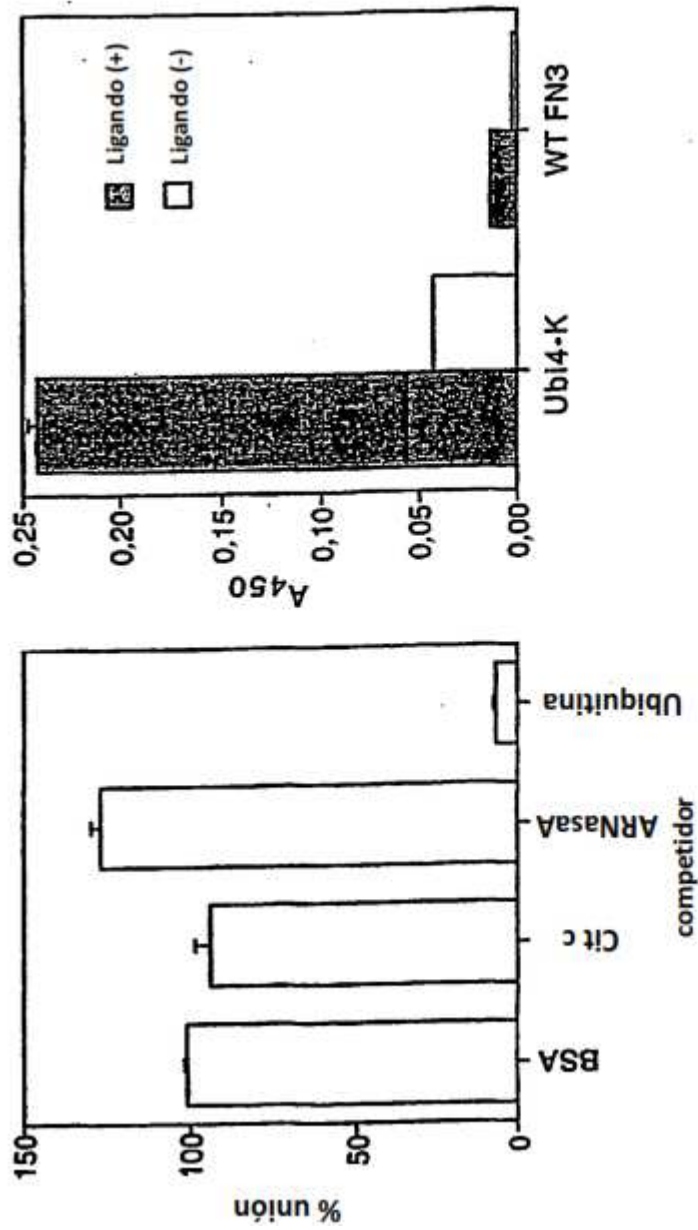


FIG. 15C

FIG. 15D

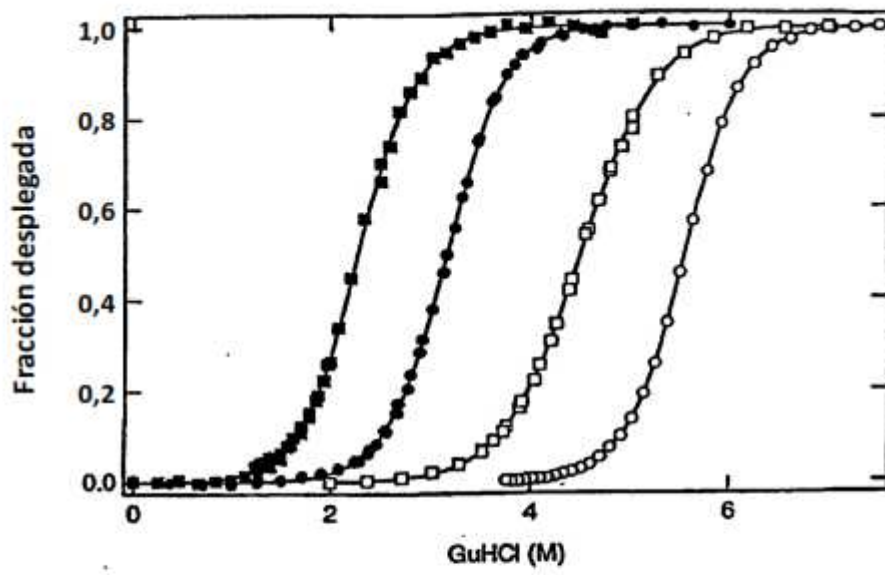


FIG. 16

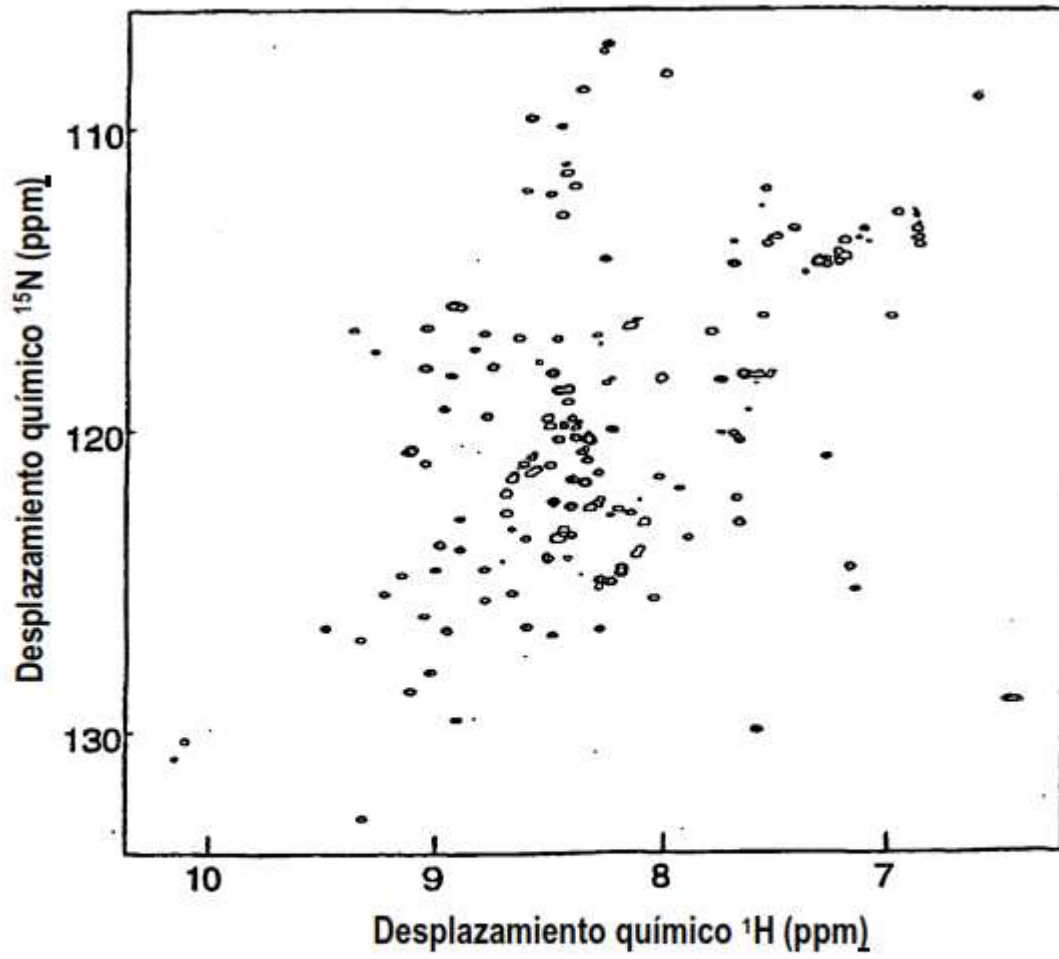


FIG. 17A

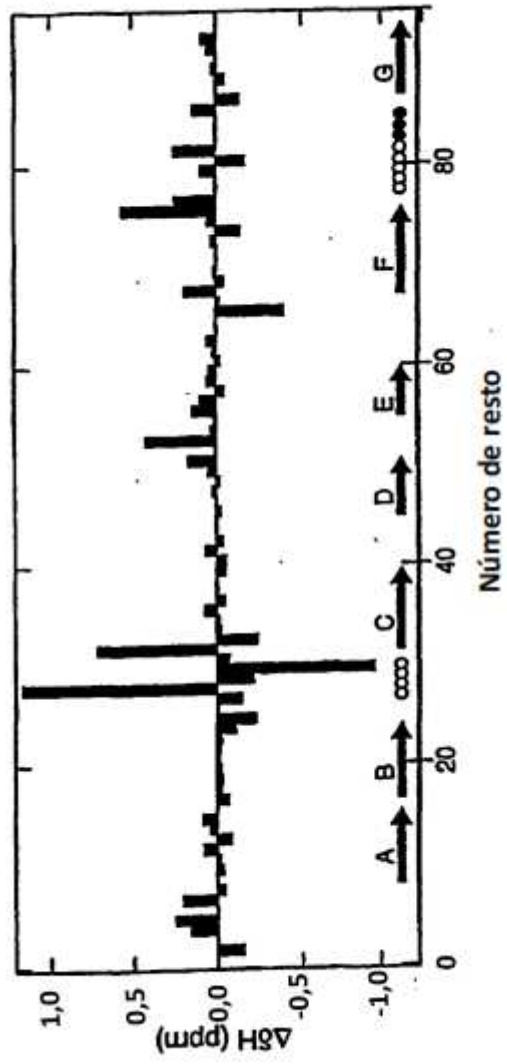


FIG. 17B

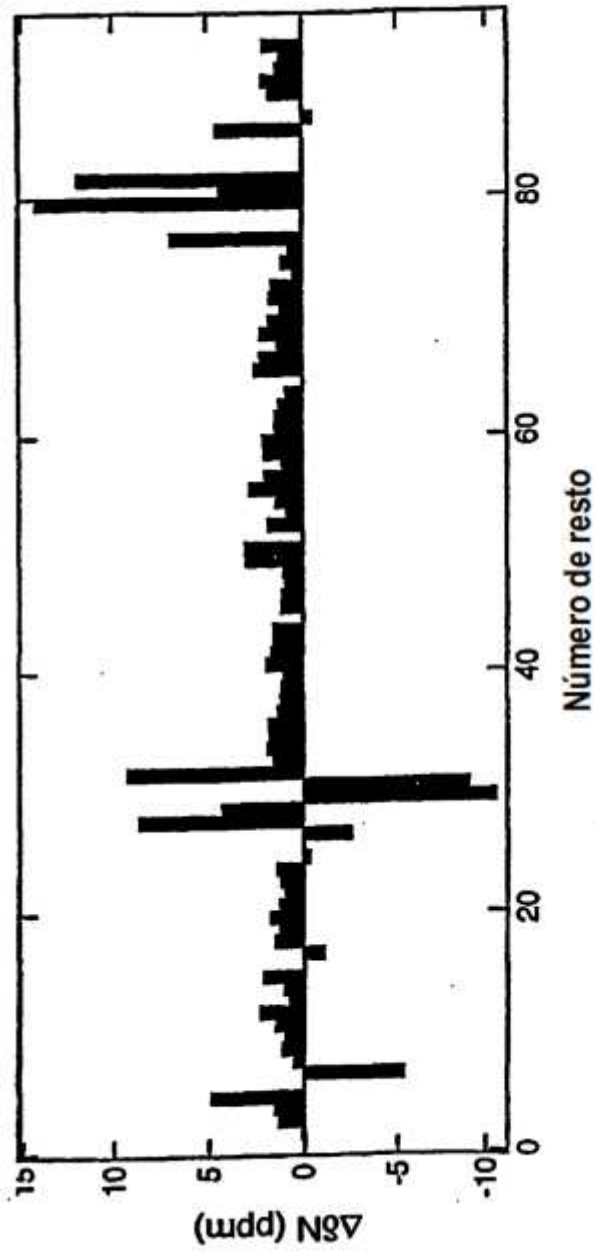


FIG. 17C

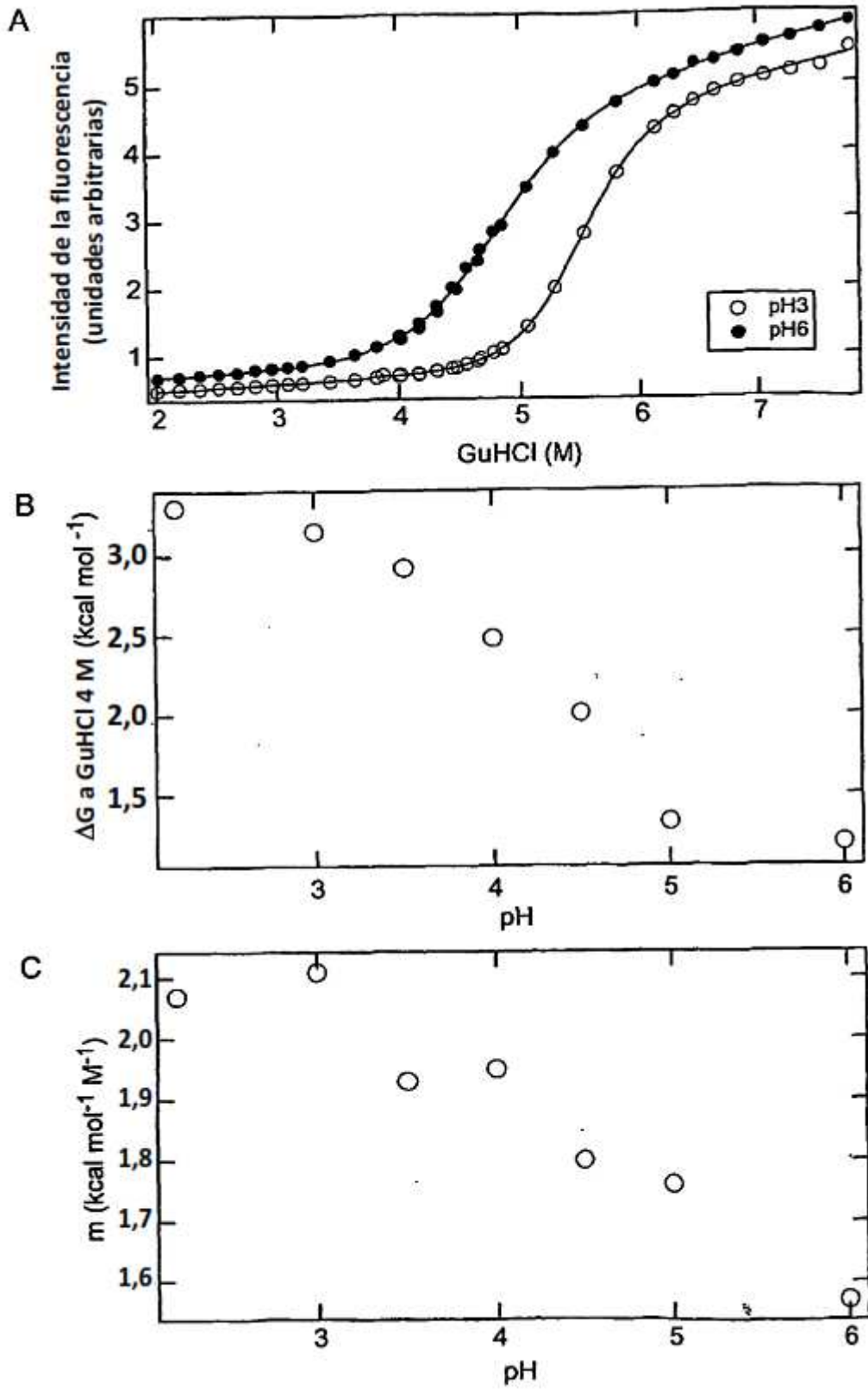


FIG. 18

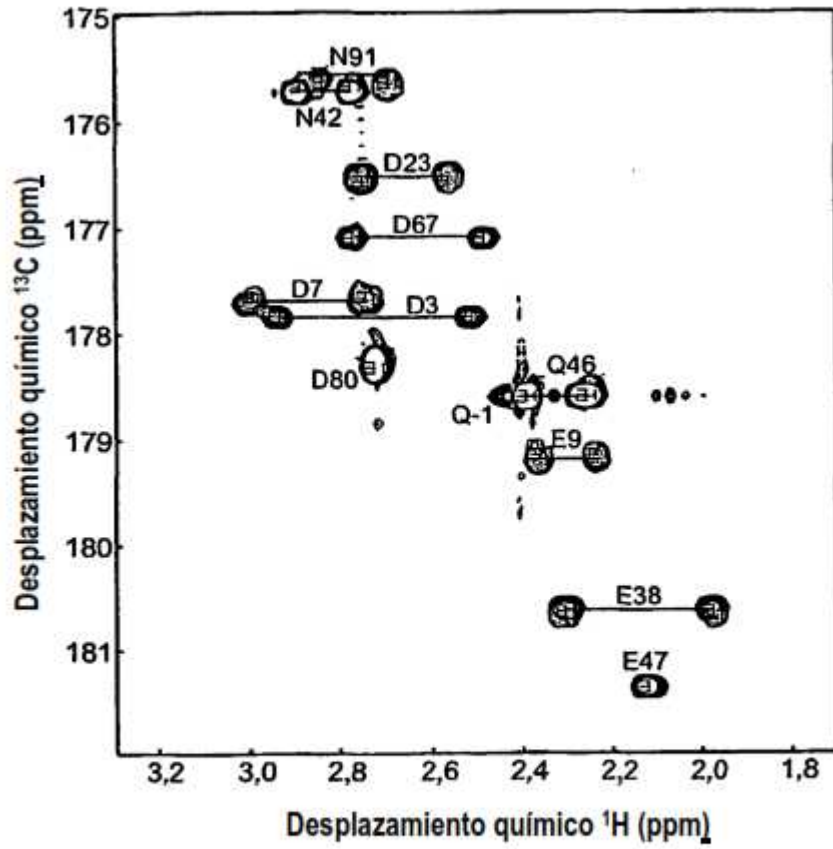


FIG. 19

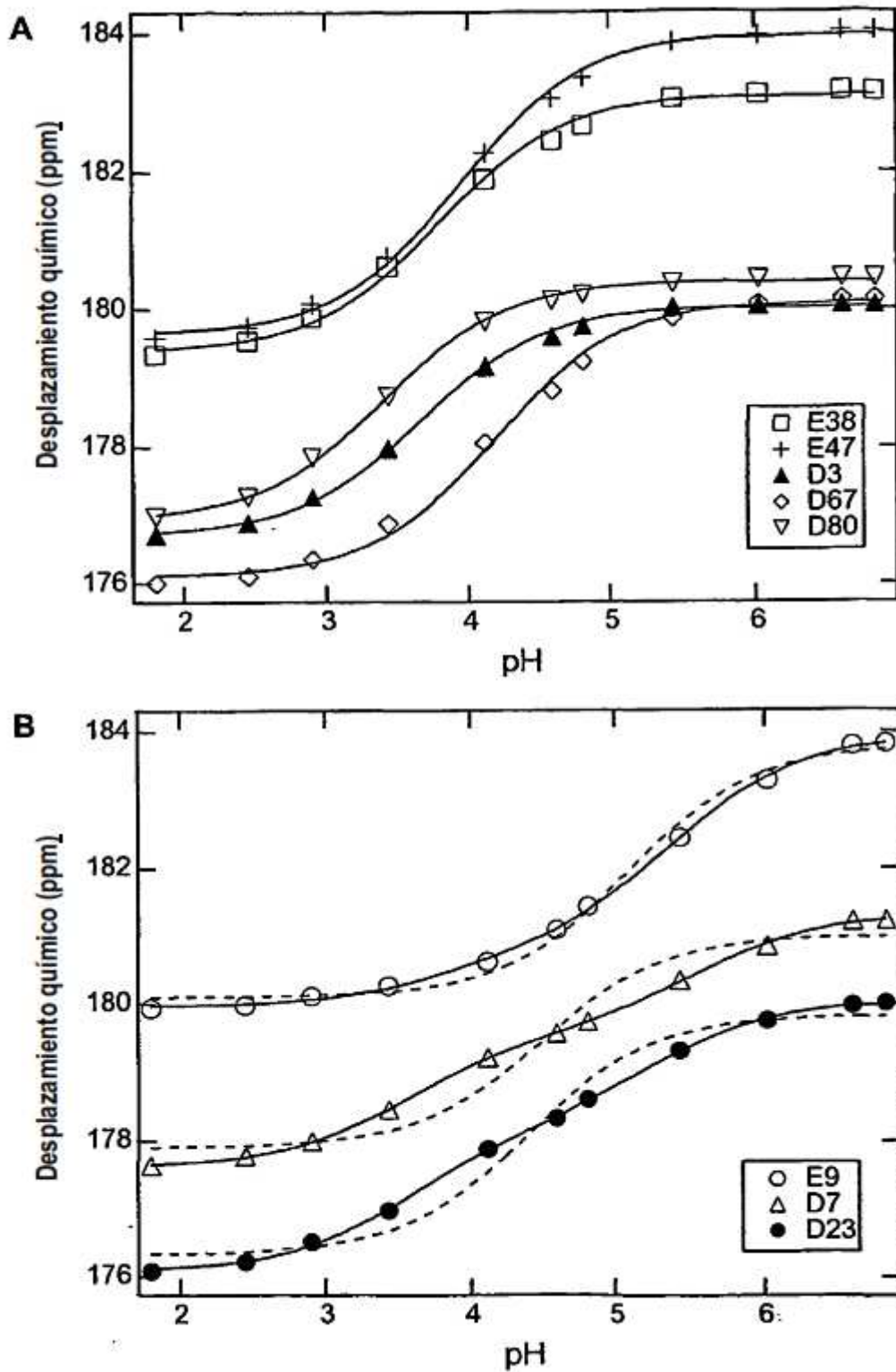


FIG. 20

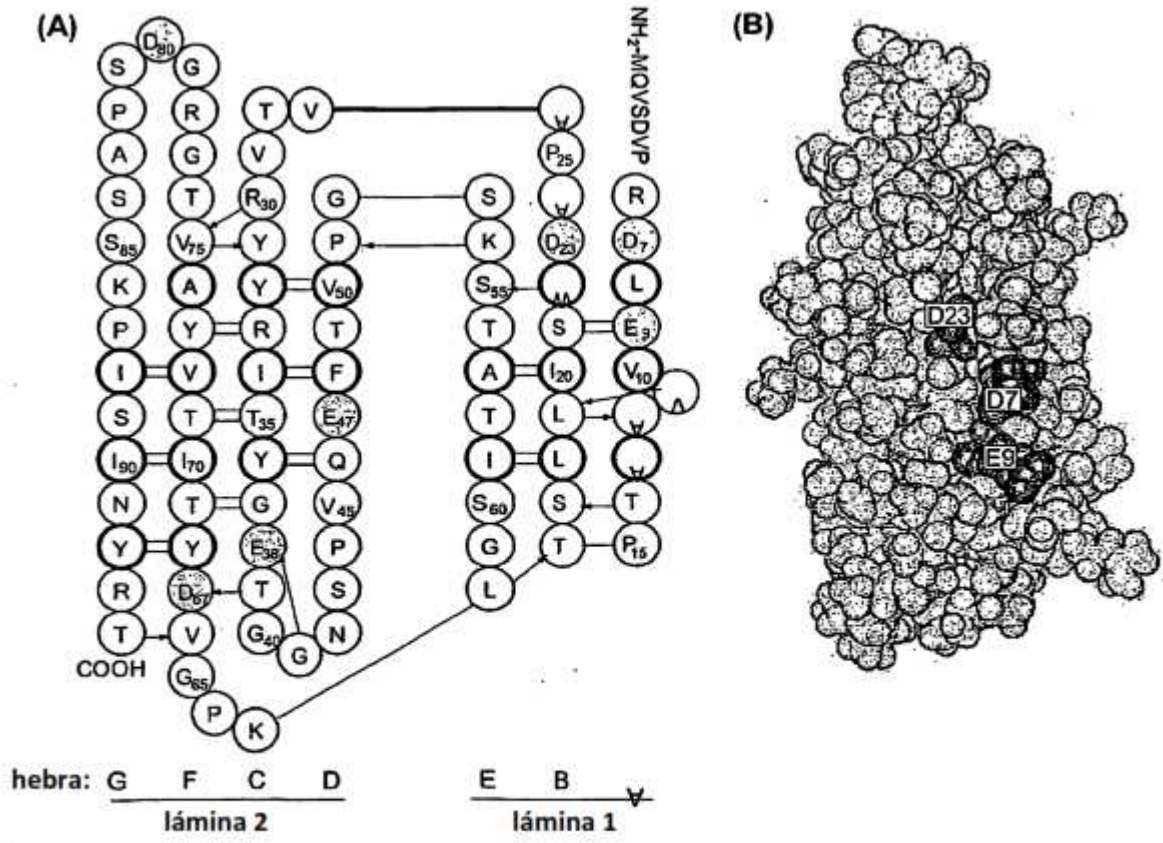


FIG. 21

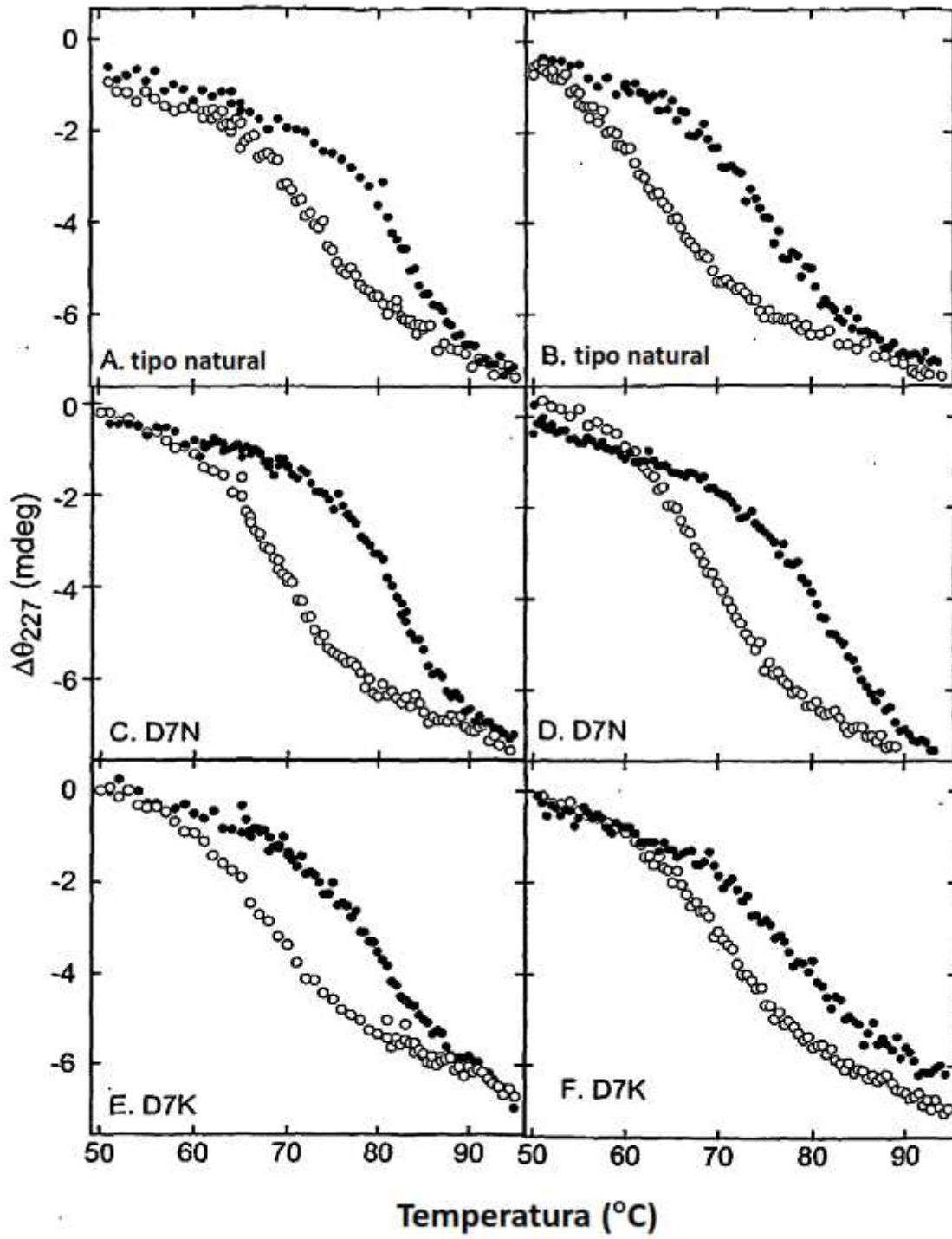


FIG. 22

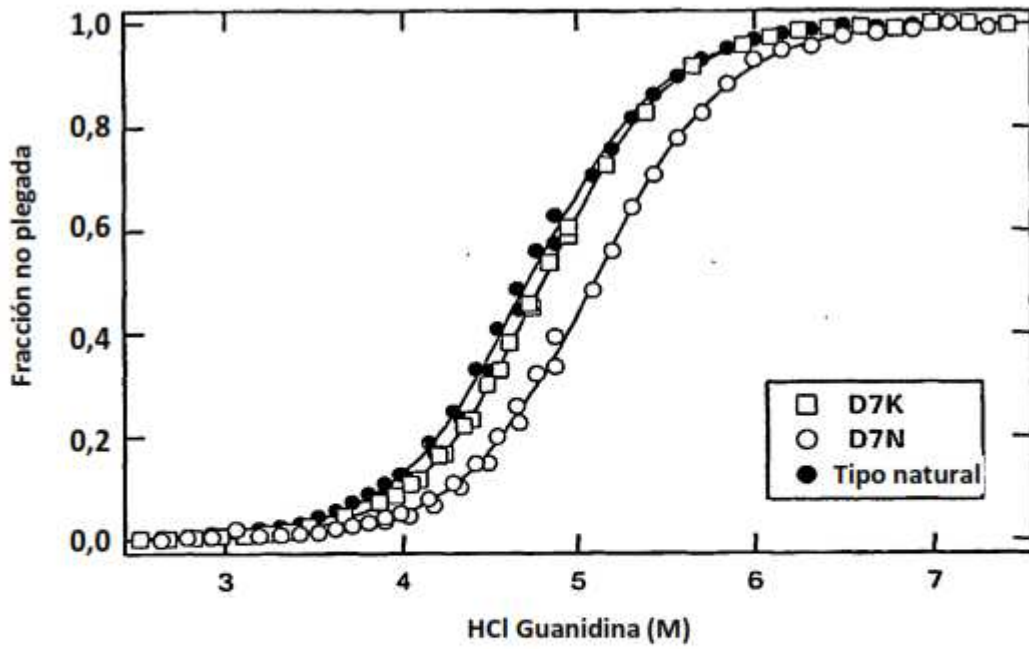


FIG. 23

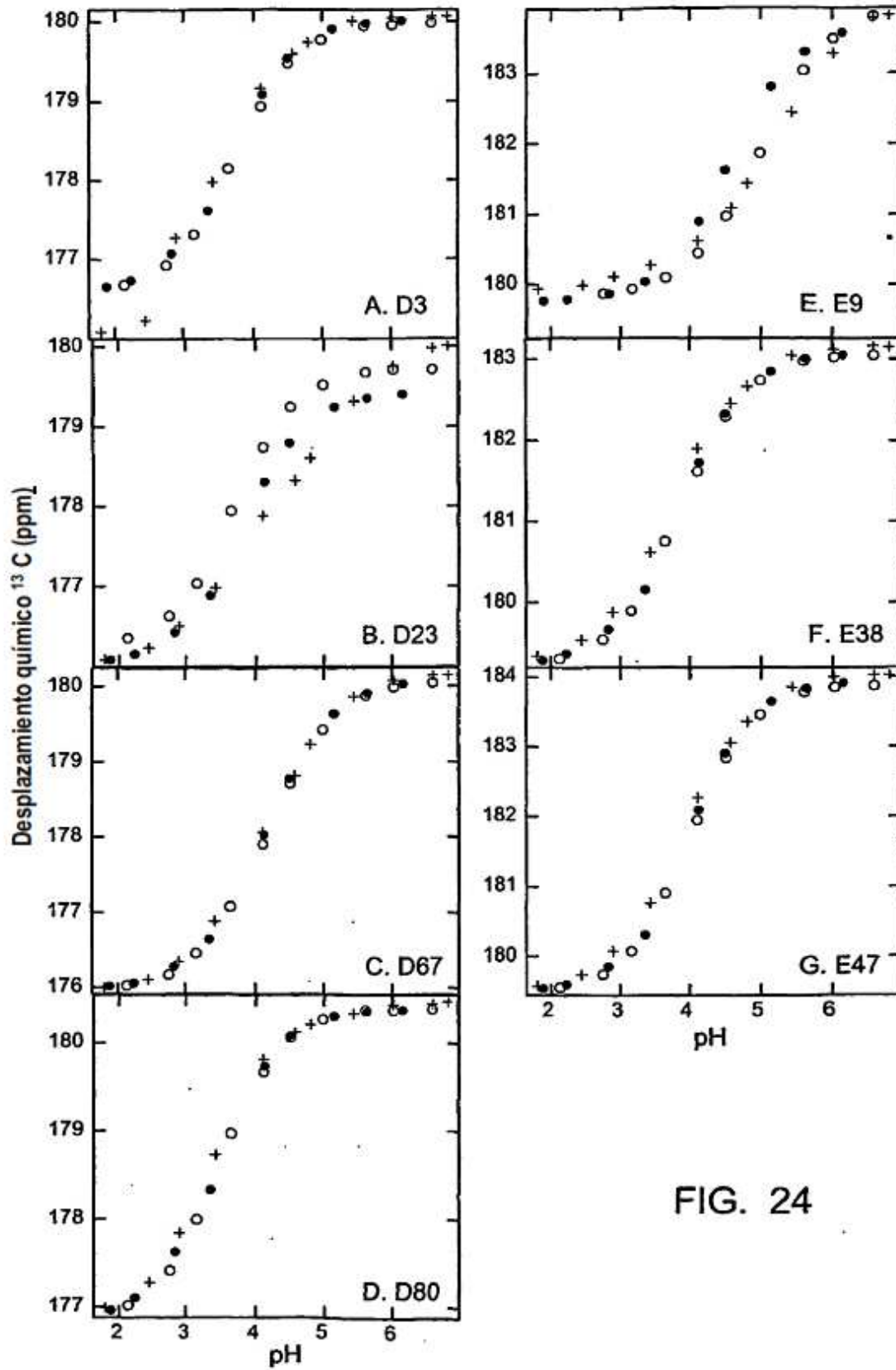


FIG. 24