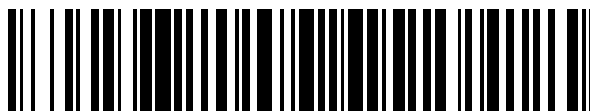


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 910**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.1999 E 09180683 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2204447**

54 Título: **Método para generar diversidad**

30 Prioridad:

09.10.1998 GB 9822104

19.01.1999 GB 9901141

09.06.1999 GB 9913435

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

07.11.2016

73 Titular/es:

MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
2nd Floor David Phillips Building Polaris House
North Star Avenue
Swindon, Wiltshire SN2 1FL, GB

72 Inventor/es:

SALE, JULIAN EDWARD;
NEUBERGER, MICHAEL,S. y
CUMBERS, SARAH JANE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 588 910 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

Método para generar diversidad

5 La presente invención se refiere a un método para generar diversidad en un gen o producto génico mediante la explotación de la capacidad de hipermutación somática natural de las células productoras de anticuerpos, así como a líneas celulares capaces de generar diversidad en productos génicos definidos.

10 Muchos *abordajes in vitro* a la generación de diversidad en productos génicos se basan en la generación de un número muy grande de mutantes que después se seleccionan usando potentes tecnologías de selección. Por ejemplo, la tecnología de expresión en fagos ha tenido mucho éxito en lo que respecta proporcionar un vehículo que permite la selección de una proteína expresada (Smith, 1985; Bass *et al.*, 1990; McCafferty *et al.*, 1990; para una revisión, véase Clackson y Wells, 1994). De manera similar, se han seleccionad ligandos peptídicos específicos por su unión a receptores mediante selección de afinidad usando grandes bibliotecas de péptidos unidos al extremo C del represor de lac Lacl (Cull *et al.*, 1992). Cuando se expresa en *E. coli*, la proteína represora une físicamente el ligando al plásmido codificante mediante la unión a una secuencia del operador lac en el plásmido. Adicionalmente, también se ha informado de un sistema de expresión en polisoma completamente *in vitro* (Mattheakis *et al.*, 1994), en el que los péptidos nacientes se unen físicamente a través del ribosoma al ARN que los codifica.

20 *In vivo*, el repertorio primario de especificidades de anticuerpos se crea mediante un proceso de reordenación del ADN que implica la unión de segmentos génicos de inmunoglobulina V, D y J. Tras el encuentro con el antígeno en ratones y seres humanos, los genes V reordenados en las células B activadas por el antígeno se someten a una segunda oleada de diversificación, esta vez mediante hipermutación somática. Esta hipermutación genera el repertorio secundario del que se pueden seleccionar buenas especificidades de unión, lo que permite la maduración por afinidad de la respuesta inmune humoral.

25 Los sistemas de selección artificial hasta la fecha se basan en gran medida en mutación y selección iniciales, similar en concepto a la fase inicial del reordenamiento V–D–J que se produce en la producción de anticuerpos naturales, en cuanto a que da como resultado la generación de un repertorio "fijo" de mutantes de productos génicos a partir de los cuales se pueden seleccionar los productos génicos que tienen la actividad deseada.

30 La selección y la evolución de ARN *in vitro* (Ellington y Szostak, 1990), a veces denominada SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (Tuerk y Gold, 1990) permite la selección tanto según la unión como la actividad química, pero solo para ácidos nucleicos. Cuando la selección se realiza según la unión, se incuba un grupo de ácidos nucleicos con el sustrato inmovilizado. Los que no se unen se eliminan mediante lavado, después se liberan los que se han unido, se amplifican y la totalidad del proceso se repite en etapas repetidas para enriquecer las secuencias de mejor unión. Este método también se puede adaptar para permitir el aislamiento de ARN y ADN catalítico (Green y Szostak, 1992; para revisiones véase Chapman y Szostak, 1994; Joyce, 1994; Gold *et al.*, 1995; Moore, 1995). Por tanto, SELEX permite etapas cíclicas de mejora de la actividad deseada, pero está limitado en su alcance a la preparación de ácidos nucleicos.

35 Al contrario que en el sistema inmunológico natural, sin embargo, los sistemas de selección artificial son poco adecuados a cualquier forma fácil de "maduración de afinidad", o etapas cíclicas de generación y desarrollo del repertorio. Una de las razones de esto es que es difícil dirigir mutaciones a regiones de la molécula en las que se requieren, por lo que los ciclos posteriores de mutación y selección no conducen al aislamiento de moléculas con actividad mejorada con eficacia suficiente.

40 Mucho de lo que se conoce sobre el proceso de hipermutación somática que se produce durante la maduración de afinidad en la producción de anticuerpos naturales se ha derivado de un análisis de las mutaciones que se han producido durante la hipermutación *in vivo* (véanse revisiones en Neuberger y Milstein, 1995; Weill y Raynaud, 1996; Parham, 1998). La mayoría de estas mutaciones son sustituciones de nucleótido único que se introducen de una manera escalonada. Ellos se encuentran dispersos sobre el dominio V reordenado, aunque con puntos calientes característicos, y las sustituciones presentan un sesgo para las transiciones de base. Las mutaciones se acumulan en gran parte durante la expansión de las células B en los centros germinales (en lugar que durante otras etapas de diferenciación y proliferación de células) con la velocidad de incorporación de las sustituciones de nucleótidos en el gen V durante la fase de hipermutación estimada a entre 10^{-4} y 10^{-3} pb⁻¹ generation⁻¹ (McKean *et al.*, 1984; Berek y Milstein, 1988)

45 La posibilidad de que las líneas de células linfoides puedan proporcionar un sistema tratable para la investigación de la hipermutación se consideró hace muchos años (Coffino y Scharff, 1971; Adetugbo *et al.*, 1977; Brüggemann *et al.*, 1982). Evidentemente, es importante que la tasa de mutación del gen V en la línea celular en estudio sea lo suficientemente alta, no solo para proporcionar un ensayo viable sino también para estar seguro de que las mutaciones están realmente generadas por el mecanismo de hipermutación de anticuerpos localizada en lugar de reflejar una tasa de mutaciones en general aumentada tal como se asocia característicamente con muchos tumores. Se han realizado amplios estudios sobre mutaciones mediante el seguimiento de la inversión de los codones de terminación en V_H en células pre-B y líneas celulares de plasmacitoma de ratón (Wabl *et al.*, 1985; Chui *et al.*, 1995;

Zhu et al., 1995; revisado por Green et al., 1998). La estrategia alternativa de la secuenciación directa del gen V expresado ha indicado que la diversificación génica de V_H en varios linfomas foliculares, de Burkitt y de Hodgkin puede continuar después del acontecimiento de transformación inicial (Bahler y Levy, 1992; Jain et al., 1994; Chapman et al., 1995 y 1996; Braeuninger et al., 1997). La secuenciación directa también ha revelado una prevalencia baja de mutaciones en una línea de linfoma folicular clonada con el argumento de que la diversificación de V_H puede continuar *in vitro* (Wu et al., 1995). Ninguno de los informes de mutación constitutiva en las líneas celulares citadas anteriormente proporciona evidencia de que las mutaciones observadas son el resultado de hipermutación dirigida, como se observa en la diversificación de anticuerpos naturales, que se concentra en los genes V, en oposición a una susceptibilidad general a la mutación como se ha descrito en muchas líneas de células tumorales de diferentes linajes.

Recientemente, Denepoux *et al.* (1997) han inducido hipermutación en una línea celular (1997), mediante el cultivo de células en presencia de anticuerpos anti-inmunoglobulina y células T activadas. Sin embargo, se declaró que la hipermutación observada era inducida, no constitutiva.

Sale JE y Neuberger MS (Immunity Dic 1998;9(6):859–69) describen una línea de linfoma de Burkitt que expresa IgM que diversifica constitutivamente su dominio V de inmunoglobulina V a una velocidad alta durante el cultivo.

Jolly CJ et al. (Nucleic Acids Res. May 1997 15;25(10):1913–9) describen métodos para el análisis de la hipermutación del gen de inmunoglobulina y su aplicación a ratones transgénicos y con genes objetivo.

Lin M et al. (Proc Natl Acad Sci USA. May 1997 13;94(10):5284–9) describen la hipermutación dependiente de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina en células B cultivadas.

Denépoux S et al. (Immunity. Ene 1997;6(1):35–46) describen la inducción de mutaciones somáticas en una línea de células B humana *in vitro*.

Green NS et al. (Mol Immunol. Oct 1997;34(15):1095–103) describen un sistema de cultivo celular en el que la inversión de un codón de terminación de la región V en un gen de Ig transfectado de forma estable permite la cuantificación de las tasas de mutación mediante análisis de fluctuación.

Green NS et al. (Immunological Reviews Abr 1998;162(1):77–87) describen la hipermutación de inmunoglobulina en células cultivadas.

Yélamos J et al. (Nature. 20 Jul 1995;376(6537):225–9) describen el direccionamiento de secuencias que no son de Ig en lugar del segmento V mediante hipermutación somática.

Källberg E et al. (Science. 1 Mar 1996;271(5253):1285–9) describen la mutación somática de genes V de inmunoglobulina *in vitro*.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de una célula eucariótica que expresa inmunoglobulina en un método *in vitro* de hipermutación constitutiva dirigida de una o más secuencias de ácido nucleico en la preparación y aislamiento de un producto génico que tiene una actividad deseada, en la que la una o más secuencias de ácido nucleico que codifican el producto génico están unidas operativamente a las secuencias control que dirigen la hipermutación somática directa del uno o más ácidos nucleicos que codifican el producto génico sin el requisito de estimulación externa para producir una o más secuencias de ácido nucleico mutadas, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico mutadas codifican un producto génico que tiene una actividad deseada, como se especifica en las reivindicaciones.

En un primer aspecto de la presente divulgación se describe un método para preparar una línea celular linfoide capaz de hipermutación constitutiva dirigida de una región de ácido nucleico diana, que comprende la detección selectiva de una población de células de diversificación de secuencias diana continua y la selección de una célula en la que la tasa de mutación del ácido nucleico diana sea superior a la de otra mutación de ácido nucleico por un factor de 100 o más.

Como se usa en el presente documento, "hipermutación constitutiva dirigida" se refiere a la capacidad, observada por primera vez en los experimentos notificados en el presente documento, de determinadas líneas celulares para causar la alteración de la secuencia de ácido nucleico de una o más secciones específicas de ADN endógeno o transgén de una manera constitutiva, es decir, sin la necesidad de estimulación externa. En las células capaces de hipermutación constitutiva dirigida, las secuencias fuera de las secciones específicas del ADN endógeno o transgén no están sometidas a tasas de mutación por encima de las tasas de mutación de fondo.

Una "región de ácido nucleico diana" es una secuencia o región de ácido nucleico en la célula según la invención que está sometida a hipermutación constitutiva dirigida. El ácido nucleico diana puede comprender una o más

unidades de transcripción que codifican productos génicos, que pueden ser homólogos o heterólogos con respecto a la célula. Los ejemplos de regiones de ácido nucleico diana son genes V de inmunoglobulina, como se encuentra en las células productoras de inmunoglobulina. Estos genes están bajo la influencia de elementos reclutadores de hipermutación, como se describe adicionalmente más adelante, que dirigen la hipermutación al locus en cuestión.

5 Otras secuencias de ácido nucleico diana se pueden construir, por ejemplo, mediante la sustitución de las unidades de transcripción de genes V en loci que contienen elementos de reclutamiento de hipermutación con otra unidad de transcripción deseada, o mediante la construcción de genes artificiales que comprenden elementos de reclutamiento de hipermutación.

10 "Hipermutación" se refiere a la mutación de un ácido nucleico en una célula a una velocidad por encima de la del fondo. Preferentemente, la hipermutación se refiere a una tasa de mutación de entre 10^5 y 10^3 pb⁻¹ generación⁻¹. Esto es en gran medida en exceso de las tasas de mutación de fondo, que son del orden de 10^{-9} a 10^{-10} mutaciones pb⁻¹ generación⁻¹ (Pato *et al.*, 1988) y de mutaciones espontáneas observadas en la PCR. 30 ciclos de amplificación con Pfu polimerasa producirán $<0,05 \times 10^{-3}$ mutaciones de pb⁻¹ en el producto, que en el presente caso representaría menos de 1 de 100 de las mutaciones observadas (Lundberg *et al.*, 1991).

La hipermutación es una parte de la generación natural de los genes de la cadena variable (V) de inmunoglobulina. Por tanto, según la presente invención, la línea celular es, preferentemente, una línea de células productoras de inmunoglobulina que es capaz de producir al menos un gen V de inmunoglobulina. Un gen V puede ser un gen de la cadena ligera variable (V_L) o de la cadena pesada variable (V_H) y puede producirse como parte de una molécula de inmunoglobulina entera; que puede ser un gen V de un anticuerpo, un receptor de células T o de otro miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas están implicados en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo papeles generalizados en el sistema inmunológico (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de células T y similares), participación en la adhesión celular (por ejemplo las moléculas ICAM) y la señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como el receptor de PDGF). Por tanto, las líneas celulares preferentes de acuerdo con la invención derivan de células B. De acuerdo con la presente invención, se ha determinado que se pueden aislar líneas celulares derivadas de células B productoras de anticuerpos que retienen la capacidad de hipermutar genes de la región V, sin embargo, no hipermutan otros genes.

30 En una realización preferida, las células según la invención derivan de células que hipermutan *in vivo* o están relacionadas con ellas. Las células que hipermutan *in vivo* son, por ejemplo, células que expresan inmunoglobulina, tales como las células B. Las células de linfoma, que son tumores de células que expresan Ig, son candidatos particularmente buenos para el aislamiento de líneas celulares hipermutantes de forma constitutiva de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "detección de diversificación continua de secuencias diana" se refiere a la determinación de la presencia de hipermutación en la región de ácido nucleico diana de las líneas celulares que se están analizando. Esto se puede realizar de diversas formas, incluyendo la secuenciación directa o métodos indirectos, tales como el ensayo de MutS (Jolly *et al.*, 1997) o el control de la generación de variantes de pérdida de inmunoglobulina. Las células seleccionadas de acuerdo con este procedimiento son células que muestran diversificación de la secuencia diana.

45 La población de células que se somete a la selección mediante el método de la divulgación puede ser una población policlonal que comprende diversos tipos de células y/o diversas secuencias diana, o una población (mono)clonal de células.

Una población clonal de células es una población de células derivadas de un único clon, de forma que las células serían idénticas, excepto por las mutaciones que se producen en las mismas. El uso de una población celular clonal excluye, preferentemente, el cultivo con otros tipos de células, tales como las células T activadas, con el objetivo de inducir la hipermutación del gen V.

Las células de acuerdo con la invención no se basan en el uso de etapas de inducción con el fin de producir hipermutación.

55 Preferentemente, la población celular clonal que se ha sometido a detección selectiva en la presente divulgación deriva de una célula B. Ventajosamente, se trata de una línea celular de linfoma, tal como una línea celular de linfoma de Burkitt, una línea celular de linfoma folicular o una línea celular de linfoma difuso de células grandes.

60 Preferentemente, el método de acuerdo con la divulgación comprende adicionalmente las etapas de aislar una o más células que muestran diversificación de la secuencia diana y comparar la tasa de acumulación de mutaciones en las secuencias diana con la de las secuencias no diana en las células aisladas.

Una característica de la presente divulgación es que la hipermutación está dirigida únicamente a regiones de ácido nucleico (diana) específicas y no se observa fuera de estas regiones de una manera general. Por tanto, la especificidad se analiza como parte del método de la divulgación mediante el ensayo de la tasa de mutación de

secuencias distintas de las secuencias diana. Los genes de la región C, que no están expuestos de forma natural a la hipermutación, pueden usarse ventajosamente en una técnica de este tipo, aunque también se puede usar cualquier otra región de ácido nucleico que no está sujeta a hipermutación específica. Dado que la hipermutación no depende de la secuencia, la secuencia real de la región de ácido nucleico seleccionada para fines de comparación no es importante. Sin embargo, no debe estar sujeto a secuencias control que dirigen la hipermutación, como se describe a continuación. De forma conveniente, la mutación de fondo puede evaluarse mediante análisis de fluctuación, por ejemplo en el locus HPRT [véase Luria y Delbreck., (1943); Capizzi y Jameson, (1973)].

Las células en las que la mutación en la región diana excede la mutación en la región no diana son células capaces de hipermutación constitutiva dirigida de una región de ácido nucleico específica de acuerdo con la presente invención. El factor por el cual la mutación en el gen de la región V supera otra mutación génica es variable, pero, en general, es del orden de al menos 10^2 , ventajosamente 10^3 y, preferentemente, 10^4 o más.

Las tasas de mutación globales y la diversidad se pueden aumentar, por ejemplo, mediante la administración de mutágenos o la expresión de genes de codificación de secuencias, tales como la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Sin embargo, no se espera que la diferencia entre la hipermutación y el fondo aumente de este modo.

En un segundo aspecto de la presente divulgación, se describe un método para preparar un producto génico que tiene una actividad deseada, que comprende las etapas de:

- a) expresar un ácido nucleico que codifica el producto génico en una población de células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, unido operativamente a un ácido nucleico que dirige la hipermutación;
- b) identificar una célula o células dentro de la población de células que expresa un producto génico mutante que tiene la actividad deseada; y
- c) establecer una o más poblaciones clonales de células a partir de la célula o células identificadas en la etapa (b) y seleccionar a partir de dichas poblaciones clonales una célula o células que exprese un producto génico que tiene una actividad deseada mejorada.

La población de células de acuerdo con la parte a) anterior deriva de una población clonal o policlonal de células que comprende células identificadas por un método de acuerdo con el primer aspecto de la divulgación como capaces de producir hipermutación constitutiva de genes de la región V. Por tanto, el producto génico puede el polipéptido de inmunoglobulina endógena, un producto génico expresado por un gen endógeno manipulado o un producto génico expresado por una unidad de transcripción heteróloga unida operativamente a secuencias control que dirigen la hipermutación somática directa, como se describe más adelante.

El ácido nucleico que se expresa en las células de la divulgación y se somete a hipermutación puede ser una región endógena, tal como la región V endógena, o una región heteróloga insertada en la línea celular de la invención. Esto puede tomar la forma de, por ejemplo, un reemplazo de la región V endógena con una o más unidades de transcripción heterólogas, tal como una región V heteróloga, reciclando las secuencias control endógenas que dirigen la hipermutación; o de la inserción en la célula de una unidad de transcripción heteróloga bajo el control de sus propias secuencias control a la hipermutación directa, en la que la unidad de transcripción puede codificar genes de la región V o cualquier otro producto génico deseado. El ácido nucleico de acuerdo con la divulgación se describe con más detalle a continuación.

En la etapa b) anterior, las células se someten a detección selectiva de la actividad del producto génico deseado. Esta puede ser, por ejemplo en el caso de las inmunoglobulinas, una actividad de unión. También se pueden evaluar otras actividades, tales como las actividades enzimáticas o similares, utilizando procedimientos de ensayo apropiados. Cuando el producto génico se expresa en la superficie de la célula, las células que producen la actividad deseada puede aislarse mediante detección de la actividad sobre la superficie celular, por ejemplo, mediante fluorescencia o mediante la inmovilización de la célula en un sustrato a través del producto génico de la superficie. Cuando la actividad se secreta en el medio de crecimiento, o, de otra manera evaluable solo para la totalidad del cultivo celular en lugar de en cada célula individual, es ventajoso establecer una pluralidad de poblaciones clonales de la etapa a) con el fin de aumentar la probabilidad de identificar una célula que secreta un producto génico que tiene la actividad deseada. Ventajosamente, el sistema de selección empleado no afecta a la capacidad de las células para proliferar y mutar.

Preferentemente, en esta etapa (y en la etapa c), se seleccionan las células que expresan productos génicos que tienen una actividad mejor, mejorada o más deseable. Tal actividad es, por ejemplo, una unión con afinidad más alta para un ligando dado o una actividad enzimática más eficaz. Por lo tanto, el método permite la selección de células sobre la base de una evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la actividad deseada.

En un tercer aspecto de la presente divulgación, se proporciona el uso de una célula capaz de producir hipermutación constitutiva dirigida de una región de ácido nucleico específica en la preparación de un producto génico que tiene una actividad deseada.

En el uso de acuerdo con la divulgación, un ácido nucleico que codifica el producto génico que tiene la actividad deseada está unido operativamente a secuencias control que dirigen la hipermutación dentro de la célula. Por tanto, generaciones sucesivas de la célula producen mutantes de la secuencia de ácido nucleico, que se someten a detección selectiva mediante el método de la divulgación para aislar mutantes con propiedades ventajosas.

- 5 Breve descripción de las figuras
- Figura 1 Diversidad de V_H en las líneas de Burkitt.
- 10 A) Diversidad de secuencias en los genes de V_H reordenados de cuatro líneas de linfoma de Burkitt esporádico, mostrada como gráficos de sectores. El número de clones de M13 secuenciados para cada línea celular se indica en el centro del pastel; los tamaños de los diversos segmentos representan la proporción de las secuencias que se distinguen por 0, 1, 2 mutaciones etc. (como se indica) con respecto a la consenso.
- 15 B) Relación dinástica supuesta de las mutaciones en V_H identificadas en el cultivo inicial de Ramos. Cada círculo (con sombreado proporcional al grado de mutación) representa una secuencia distinta, con el número de mutaciones acumuladas indicado dentro del círculo.
- (C) Prevalencia de las mutaciones los genes de V_H reordenados. En Ramos se identifican dos reordenamientos de V_H . La diversidad y la asignación del origen de la línea germinal se presenta como en la figura 1A.
- 20 (D) Comparación de la prevalencia de la mutación en las regiones V_H y C_H del cultivo inicial de Ramos. Los gráficos por sectores se presentan como en la figura 1A.
- Figura 2 Diversificación constitutiva de V_H en Ramos.
- 25 A) La diversificación evaluada por un ensayo de MutS. Se indica la prevalencia de la mutación en cada población tal como se deduce por la clonación y secuenciación directa.
- (B) Relaciones dinásticas deducidas de la progenie de tres clones independientes de Ramos.
- Figura 3 Distribución de sustituciones de nucleótidos no seleccionados a lo largo de la V_H de Ramos.
- 30 Figura 4. La hipermutación en Ramos genera diversas variantes de pérdida de IgM reversibles.
- (A) Esquema que muestra el aislamiento de las variantes de pérdida de IgM.
- 35 B) Tabla que muestra que múltiples mutaciones sin sentido pueden contribuir a la inactivación de V_H . Se enumera cada posición del codón de V_H en la que se observan paradas en estas dos poblaciones.
- (C) Tabla de las tasas de reversión de las variantes de pérdida de IgM.
- (D) Secuencia que rodea a los codones de terminación en los derivados de pérdida de IgM.
- Figura 5. Variantes de pérdida de IgM en transfectantes de Ramos que expresan TdT.
- 40 (A) Análisis de transferencia Western de la expresión de TdT en tres pSV-p β G/TdT y tres transfectantes de control de Ramos.
- (B) Gráficos de sectores que representan los acontecimientos mutacionales independientes que dan lugar a variantes de pérdida de IgM.
- 45 Figura 6. Tabla de secuencias que resume las mutaciones en V_H aparte de sustituciones de nucleótidos individuales.
- Figura 7. Comparación de secuencias aisladas de genes de V_H de las células de Ramos que han especificidad de unión antiidiotipo (anti-Id1). Las sustituciones de nucleótidos que difieren del consenso de la población de partida se muestran en negrita. Los cambios de aminoácidos predichos se indican también en negrita.
- 50 Figura 8. Gráfico de barras que muestra el enriquecimiento de las células de Ramos para la producción de una inmunoglobulina con una especificidad de unión nueva, mediante selección iterativa durante cinco rondas.
- Figura 9. Gráfico de barras que muestra una mejora de la recuperación de las células Ramos con una especificidad de unión nueva (estreptavidina) mediante el aumento de la relación perla:célula.
- 55 Figura 10. Gráfico que muestra un incremento de la recuperación de células de Ramos con una especificidad de unión nueva de acuerdo con el aumento de la concentración del antígeno diana.
- 60 Figura 11. Secuencia de V_H derivada de las células Ramos que se unen a estreptavidina. Los cambios de nucleótidos observados en comparación con la secuencia de V_H de la población de partida y los cambios de aminoácidos predichos se muestran en negrita.
- 65 Figura 12. Cantidad de IgM en los sobrenadantes de células seleccionadas en las rondas 4, 6 y 7 de un proceso de selección para la unión a estreptavidina, contra el medio de control y el sobrenadante de células de Ramos no seleccionadas.

Figura 13. Unión a estreptavidina de IgM a partir de los sobrenadantes de la figura 12.

Figura 14. Unión a estreptavidina de los sobrenadantes de la ronda 4 y la ronda 6 de una selección de unión a estreptavidina, analizada por resonancia de plasmón superficial.

Figura 15. Análisis FACS de la unión a estreptavidina-FITC de células seleccionadas en las rondas 4 y 6.

Figura 16. Secuencias de V_H y V_L de la IgM seleccionada en la ronda 6.

Descripción detallada de la invención

La presente invención hace disponible por primera vez una línea celular que hipermuta de forma constitutiva determinadas regiones de ácidos nucleicos. Esto permite el diseño de sistemas que producen productos génicos mutados por una técnica que refleja la maduración de afinidad en la producción de anticuerpos naturales. La línea de células de Ramos de Burkitt diversifica constitutivamente su gen V de inmunoglobulina reordenado durante el cultivo *in vitro*. Esta hipermutación no requiere la estimulación por células T activadas, citocinas añadidas exógenamente o incluso el mantenimiento del receptor de antígeno de las células B.

La tasa de mutación (que se encuentra en el intervalo de $0,2-1 \times 10^{-4}$ pb⁻¹ generación⁻¹) es lo suficientemente alta como para permitir fácilmente la acumulación de una gran base de datos de mutaciones no seleccionadas y, por lo tanto, revelan que la hipermutación en Ramos exhibe la mayor parte de las características que normalmente se asocian con hipermutación del gen V de inmunoglobulina *in vivo* (direccionamiento preferente de la mutación a V; acumulación escalonada de sustituciones de nucleótidos únicos; sesgo de transición; puntos calientes mutacionales característicos). La gran mayoría de las mutaciones en la base de datos no seleccionada son sustituciones de un solo nucleótido, aunque las deleciones y las duplicaciones (a veces con una sustitución de nucleótidos flanqueantes) son detectables. Asimismo, se ha propuesto que tales deleciones y duplicaciones se generan como consecuencia de la hipermutación *in vivo* (Wilson et al., 1998; Goosens et al., 1998; Wu y Kaartinen, 1995).

El aislamiento de células que hipermutan de forma constitutiva determinadas regiones de ácidos nucleicos se basa en el seguimiento de la mutación del gen V en líneas celulares derivadas de células productoras de anticuerpos, tales como células B. El método de selección empleado en la divulgación puede configurarse de varias formas.

Selección de células hipermutantes

Las células hipermutantes se pueden seleccionar de una población de células mediante diversas técnicas, incluyendo secuenciación de las secuencias diana, la selección de mutantes de pérdida de expresión, ensayo utilizando la proteína MutS bacteriana y selección de cambios en la actividad del producto génico.

Una de las características de la hipermutación de los ácidos nucleicos diana es que el proceso da lugar a la introducción de codones de terminación en la secuencia diana con una frecuencia mucho mayor de la que se observaría en ausencia de hipermutación. Esto da lugar a la pérdida de producción de un producto génico de la célula. Esta pérdida se puede explotar para identificar las células que son secuencias de ácidos nucleicos hipermutantes.

En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico diana codifica una inmunoglobulina. La pérdida de inmunoglobulina puede detectarse tanto para las células que secretan inmunoglobulinas en el medio de cultivo como para las células en las que se expresa la inmunoglobulina en la superficie celular. Cuando la inmunoglobulina está presente en la superficie celular, su ausencia puede identificarse para células individuales, por ejemplo mediante análisis FACS, microscopía de inmunofluorescencia o inmovilización del ligando en un soporte. En una realización preferida, las células se pueden mezclar con perlas magnéticas recubiertas de antígeno que, cuando se sedimentan, se retirarán de la suspensión celular todas las células que tengan una inmunoglobulina de la especificidad deseada mostrada en la superficie.

La técnica puede extenderse a cualquier molécula de inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos, receptores de células T y similares. La selección de moléculas de inmunoglobulina dependerá de la naturaleza de la población clonal de células que se desea analizar de acuerdo con la invención.

Como alternativa, las células de acuerdo con la divulgación pueden seleccionarse mediante secuenciación de ácidos nucleicos diana, tales como genes V, y la detección de mutaciones por comparación de secuencias. Este proceso puede automatizarse con el fin de aumentar el rendimiento.

En una realización adicional, las células que hipermutan genes V pueden detectarse mediante la evaluación del cambio en la actividad de unión al antígeno en las inmunoglobulinas producidas en una población celular clonal. Por ejemplo, la cantidad de antígeno unido por una cantidad unitaria específica de medio o extracto celular se puede evaluar con el fin de determinar la proporción de inmunoglobulina producida por la célula que conserva una actividad

de unión especificada. Como se mutan los genes V, la actividad de unión se variará y se reducirá la proporción de inmunoglobulina producida que se une a un antígeno específico.

5 Como alternativa, las células pueden evaluarse de una manera similar según la capacidad de desarrollar una afinidad de unión nueva, tal como mediante su exposición a un antígeno o mezcla de antígenos que inicialmente no están unidos y observando si una afinidad de unión se desarrolla como resultado de la hipermutación.

10 En una realización adicional, el ensayo MutS bacteriano puede usarse para detectar la variación de secuencia en los ácidos nucleicos diana. La proteína MutS se une a los apareamientos erróneos en los híbridos de ácidos nucleicos. Mediante la creación de heterodúplex entre los ácidos nucleicos parentales y los de la progenie potencialmente mutada, puede evaluarse la extensión de la formación de apareamientos erróneos y, por lo tanto, la extensión de la mutación del ácido nucleico.

15 Cuando el ácido nucleico diana codifica un producto génico distinto de una inmunoglobulina, la selección puede realizarse mediante detección selectiva de la pérdida o alteración de una función distinta de la unión. Por ejemplo, la pérdida o alteración de una actividad enzimática pueden someterse a detección selectiva.

20 Las células cuya hipermutación de la secuencia diana de secuencia se evalúan para detectar mutaciones en otras regiones de ácido nucleico. Una región conveniente para analizar es la región constante (C) de un gen de inmunoglobulina. Las regiones C no están sujetas a la hipermutación dirigida de acuerdo con la invención. La evaluación de las regiones C se hace, preferentemente, mediante secuenciación y comparación, ya que este es el método más seguro para la determinación de la *ausencia* de mutaciones. Sin embargo, se pueden emplear otras técnicas, tales como el seguimiento de la retención de las actividades de la región C, por ejemplo, fijación del complemento, que pueden estar alteradas por los acontecimientos de hipermutación.

25 Adaptación de los productos génicos endógenos

30 Después de haber obtenido una línea celular que hipermuta de forma constitutiva un gen endógeno, tal como un gen de la región V de inmunoglobulina, la presente invención proporciona la adaptación del producto génico endógeno, mediante hipermutación constitutiva, para producir un producto génico que tiene nuevas propiedades. Por ejemplo, la presente invención proporciona la producción de una inmunoglobulina que tiene una especificidad de unión nueva una afinidad de unión alterada.

35 Se emplea el proceso de hipermutación, en la naturaleza, para generar especificidades de unión nuevas o mejoradas en moléculas de inmunoglobulina. Por lo tanto, mediante la selección de células de acuerdo con la invención que producen inmunoglobulinas capaces de unirse al antígeno deseado y, después, propagando estas células con el fin de permitir la generación de mutantes adicionales, se pueden aislar las células que expresan inmunoglobulinas que tienen una mejor unión al antígeno deseado.

40 Se pueden aplicar diversos procedimientos de selección para el aislamiento de mutantes que tienen una especificidad deseada. Estos incluyen clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), separación de las células usando partículas magnéticas, métodos de cromatografía de antígenos y otras técnicas de separación celular, tales como el uso de perlas de poliestireno.

45 La separación de las células utilizando captura magnética puede llevarse a cabo conjugando el antígeno de interés a partículas o perlas magnéticas. Por ejemplo, el antígeno puede estar conjugado a partículas o perlas superparamagnéticas de hierro-dextrano suministradas por Miltenyi Biotec GmbH. A continuación, estas partículas o perlas conjugadas se mezclan con una población de células que pueden expresar una diversidad de inmunoglobulinas en la superficie. Si una célula particular expresa una inmunoglobulina capaz de unirse al antígeno, formará un complejo con las perlas magnéticas en virtud de esta interacción. Después, se aplica un campo magnético a la suspensión, que inmoviliza las partículas magnéticas y retiene todas las células que están asociadas con ellas a través del antígeno unido covalentemente. Las células no unidas, que no se unen a las perlas se eliminan después por lavado, dejando una población de células que se aísla únicamente según su capacidad para unirse al antígeno de interés. Se dispone de reactivos y kits de diversas fuentes para la realización de tales aislamientos en una sola etapa e incluyen perlas Dynal Beads (Dynal AS; <http://www.dynal.no>), clasificación celular magnética-MACS (Miltenyi Biotec GmbH; <http://www.miltenyibiotec.com>), CliniMACS (AmCell; <http://www.amcell.com>) así como Biomag, perlas Amerlex-M y otros.

60 La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se puede utilizar para aislar las células sobre la base de sus diferentes moléculas de la superficie, por ejemplo inmunoglobulinas expresadas en la superficie. Las células en la muestra o población a que se debe clasificar se tiñen con reactivos fluorescentes específicos que se unen a las moléculas de la superficie celular. Estos reactivos serían el antígeno o antígenos de interés unidos (ya sea directa o indirectamente) a marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína, rojo Texas, verde malaquita, proteína fluorescente verde (GFP) o cualquier otro fluoróforo conocido por los expertos en la técnica. A continuación, la población celular se introduce entonces en la cámara de flujo vibrante de la máquina de FACS. La corriente de células que sale de la cámara está encerrada en una vaina de fluido tampón tal como PBS (solución salina

tamponada con fosfato). La corriente es iluminada por luz láser y en cada célula se mide la fluorescencia, que indica la unión del antígeno marcado fluorescente. La vibración en la corriente celular hace que se rompa en gotitas, que llevan una pequeña carga eléctrica. Estas gotitas pueden estar dirigidas por placas de deflexión eléctrica bajo control por ordenador para recoger diferentes poblaciones celulares según su afinidad por el antígeno marcado con fluorescencia. De esta manera, las poblaciones celulares que muestran diferentes afinidades por el antígeno o antígenos de interés pueden separarse fácilmente de las células que no se unen al antígeno. Las máquinas y reactivos de FACS para su uso en FACS están ampliamente disponibles en de fuentes de todo el mundo tales como Becton-Dickinson, o de proveedores de servicios en todo el mundo como Arizona Research Laboratories (<http://www.arl.arizona.edu/facs/>).

Otro método que se puede utilizar para separar poblaciones celulares de acuerdo con la afinidad de su proteína o proteínas de la superficie celular para un antígeno particular es la cromatografía de afinidad. En este método, una resina adecuada (por ejemplo CL-600 Sepharose, Pharmacia Inc.) está unida covalentemente al antígeno apropiado. Esta resina se empaqueta en una columna y la población mixta de las células se hace pasar sobre la columna. Después de un período de incubación adecuado (por ejemplo, 20 minutos), las células no unidas se eliminan por lavado usando (por ejemplo) tampón PBS. Esto deja sólo la subpoblación de células que expresan inmunoglobulinas que se unen al antígeno o antígenos de interés y, a continuación, estas células se eluyen de la columna usando (por ejemplo) un exceso del antígeno de interés o escindiendo enzimática o químicamente el antígeno de la resina. Esto se puede hacer usando una proteasa específica, tal como factor X, trombina u otra proteasa específica conocida por los expertos en la técnica para escindir el antígeno de la columna a través de un sitio de escisión apropiado que previamente se ha incorporado en el complejo antígeno-resina. Como alternativa, se puede usar una proteasa no específica, por ejemplo tripsina, para eliminar el antígeno de la resina, liberando de este modo la población de células que exhiben afinidad por el antígeno de interés.

Inserción de unidades de transcripción heterólogas

Con el fin de maximizar las posibilidades de seleccionar rápidamente una variante de anticuerpo capaz de unirse a cualquier antígeno dado o de explotar el sistema de hipermutación para genes no correspondientes a inmunoglobulina, se puede usar una serie de técnicas para manipular células de acuerdo con la invención, de tal manera que se pueden explotar sus capacidades de hipermutación.

En una primera realización, los transgenes se transfectan en una célula de acuerdo con la invención de modo que los transgenes se convierten en dianas para los acontecimientos de hipermutación dirigida.

Como se usa en el presente documento, un "transgén" es una molécula de ácido nucleico que se inserta en una célula, tal como mediante transfección o transducción. Por ejemplo, un "transgén" puede comprender una unidad de transcripción heteróloga como se ha hecho referencia anteriormente, que puede insertarse en el genoma de una célula en una ubicación deseada.

Los plásmidos utilizados para liberar el transgén a las células son de construcción convencional y comprenden una secuencia de codificación, que codifica el producto génico deseado, bajo el control de un promotor. La transcripción de genes a partir de vectores en células de acuerdo con la invención puede controlarse mediante promotores derivados de los genomas de virus, tales como el virus del polio, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos tales como el promotor de la actina o un promotor muy fuerte, por ejemplo, un promotor de la proteína ribosómica, y a partir del promotor normalmente asociado con la secuencia de codificación heteróloga, siempre que dichos promotores sean compatibles con el sistema huésped de la invención.

La transcripción de una secuencia de codificación heteróloga por las células de acuerdo con la invención se puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (por ejemplo, elastasa y globina). Sin embargo, típicamente uno empleará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270) y el potenciador del promotor temprano del CMV. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia de codificación, pero se localiza preferentemente en un sitio en 5' desde el promotor.

De forma ventajosa, un vector de expresión eucariota puede comprender una región control del locus (LCR). Las LCR son capaces de dirigir la expresión de alto nivel independiente del sitio de integración de los transgenes integrados en la cromatina de la célula huésped, que es de importancia especialmente cuando la secuencia de codificación heteróloga se va a expresar en el contexto de una línea celular eucariota transfectada permanentemente en la que se ha producido la integración cromosómica del vector, en vectores diseñados para aplicaciones de terapia génica o en animales transgénicos.

Los vectores de expresión eucariotas también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están habitualmente disponibles a partir de las regiones sin traducir en 5' y 3' de ADN o ADNc virales o eucariotas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm.

Un vector de expresión incluye cualquier vector capaz de expresar una secuencia de codificación que codifica un producto génico deseado que está unido operativamente a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de expresión de tales ADN. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector, que, tras la introducción en una célula huésped apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen los que se pueden replicar en células eucariotas y/o procariotas y los que permanecen episomales o aquellos que se integran en el genoma de la célula huésped. Por ejemplo, los ADN que codifican una secuencia de codificación heteróloga pueden insertarse en un vector adecuado para la expresión de ADNc en células de mamífero, por ejemplo, un vector basado en el potenciador del CMV, tal como pEVRF (Matthias, et al., 1989).

La construcción de vectores de acuerdo con la invención emplea técnicas de ligación convencionales. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN se escinden, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Si se desea, el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos se realiza de una manera conocida. Los métodos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcritos *in vitro*, introducir ADN en células huésped, y realizar análisis para evaluar la expresión del producto del gen y la función son conocidos por los expertos en la técnica. La presencia, amplificación y/o expresión de genes puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm, transferencia puntual (análisis de ADN o ARN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada adecuadamente que puede estar basada en una secuencia proporcionada en el presente documento. Los expertos en la técnica preverán fácilmente cómo pueden modificarse estos procedimientos, si se desea.

En una variación de la primera realización, los transgenes de acuerdo con la invención también comprenden secuencias que dirigen la hipermutación. Dichas secuencias se han caracterizado e incluyen las secuencias expuestas en Klix *et al.*, (1998), y Sharpe *et al.*, (1991). Por lo tanto, un locus entero capaz de expresar un producto génico y dirigir la hipermutación a la unidad de transcripción que codifica el producto génico se transfiere a las células. La unidad de transcripción y las secuencias que dirigen la hipermutación son, por tanto, exógenas a la célula. Sin embargo, aunque exógenas, las secuencias que dirigen la hipermutación ellas mismas pueden ser similares o idénticas a las secuencias que dirigen la hipermutación que se encuentra de forma natural en la célula.

En una segunda realización, el gen o genes V endógenos o segmentos de los mismos pueden reemplazarse con el gen o genes V heterólogos mediante recombinación homóloga o mediante direccionamiento génico usando, por ejemplo, un sistema Lox/Cre o una tecnología análoga o mediante inserción en las líneas celulares hipermutantes que han suprimido de forma espontánea genes V endógenos. Como alternativa, el gen o genes de la región V se pueden reemplazar mediante la explotación de la observación de que la hipermutación se acompaña de roturas de doble cadena en las proximidades de los genes V reordenados.

La invención se describe adicionalmente a continuación para fines ilustrativos únicamente, mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: Selección de una célula hipermutante

Con el fin de detectar una célula que sufre hipermutación *in vitro*, se evalúa el grado de la diversidad que se acumula en varios linfomas de Burkitt humanos durante la expansión clonal. G. Lenoir (IARC, Lyon, Francia) proporciona amablemente las líneas de Burkitt BL2, BL41 and BL70 y D. Fearon (Cambridge, Reino Unido) proporciona Ramos (Klein et al., 1975). Los genes de V_H reordenados se amplifican por PCR a partir de AND genómico usando múltiples cebadores de la familia de V_H junto con un oligonucleótido consenso J_H. La amplificación de los segmentos de V_H reordenados se lleva a cabo usando la Pfu polimerasa junto con uno de 14 cebadores diseñados para cada una de las familias de V_H humanas principales (Tomlinson, 1997) y un cebador inverso consenso J_H, que hibrida con los seis segmentos J_H humanos (JOL48, 5'-GCGGTACCTGAGGAGACGGTGACC-3', regalo de C. Jolly). La amplificación de la V_H de Ramos del ADN genómico se realiza con los oligonucleótidos RVHFOR (5'-CCCCAAGCTTCCCAGGTGCAGCTACAGCAG) y JOL48, la amplificación del ADNc de V_H-C_μ expresado se realiza usando RVHFOR y C_μ2BACK (5'-CCCCGGTACCAGATGAGCTTGGACTTGCGG). La región C_μ1/2 genómica se amplifica usando C_μ2BACK con C_μ1FOR (5'-CCCCAAGCTTCGGGAGTGCATCCGCCCAACCCTT); el alelo C_μ funcional de Ramos contiene una C en el nucleótido 8 de C_μ2 frente a la T en el alelo no funcional. Las V_λs reordenadas se amplifican usando 5'-CCCCAAGCTTCCCAGTCTGCCCTGACTCAG y 5'-CCCCTCTAGACCACCTAGGACGGTC-AGCTT. Los productos de PCR se purifican usando columnas de espín QIAquick (Qiagen) y se secuencian usando un secuenciador ABI377 tras la clonación en M13. Las mutaciones se computan usando el programa de alineación GAP4 (Bonfield et al., 1995).

La secuenciación de los productos de PCR clonados revela una diversidad considerable en la línea celular de Ramos (una prevalencia de $2,8 \times 10^{-3}$ mutaciones pb⁻¹ en V_H) aunque también se observa una heterogeneidad significativa en BL41 así como en BL2. Véase la figura 1A. La diversidad de secuencias en los genes de V_H reordenados de cuatro líneas de linfoma de Burkitt esporádico, mostrada como gráficos de sectores. Los genes de V_H reordenados en cada línea celular se amplifican por PCR y se clonan en M13. Para cada línea celular, el

consenso se toma como la secuencia común al mayor número de clones de M13 y un homólogo de la línea germinal (indicado encima de cada sector) asignado sobre la base de la coincidencia más cercana utilizando la base de datos VBASE de secuencias de inmunoglobulina humana (Tomlinson, 1997). La secuencia consenso de V_H para Ramos usada en el presente documento se diferencia en 3 posiciones de la secuencia determinada por Chapman et al (1996), cinco posiciones de la determinada por Ratech (1992) y seis posiciones de su homólogo de la línea germinal más cercano $V_{H4}(DP-63)$.

El análisis de la diversidad de V_H en Ramos se extiende mediante la secuenciación de los productos procedentes de nueve amplificaciones por PCR independientes. Esto permite una probable relación dinástica entre los clones mutados en la población que se deduce, minimizando el número de repeticiones independientes presuntas de sustituciones de nucleótidos individuales (Figura 1B). Se secuenciaron 315 clones de V_H de M13 obtenidos a partir de nueve amplificaciones de PCR independientes; la dinastía solo incluye secuencias identificadas (en lugar de supuestos intermedios). Se diseñan mutaciones individuales de acuerdo con el formato "C230", siendo el 230 la posición de nucleótido en la V_H de Ramos (numeradas como en la Figura 3) y la "C" indica la nueva base en esa posición. El criterio utilizado para deducir la genealogía es una minimización del número de apariciones independientes de la misma sustitución de nucleótidos. La mayoría de las ramas contienen miembros individuales contribuidos por distintas amplificaciones por PCR. Las deleciones y duplicaciones raras se indican con el prefijo "x" y "d", respectivamente. Las flechas destacan dos mutaciones (una sustitución en la posición 264 que produce codón de terminación y una duplicación en la posición 184), cuya posición dentro del árbol implica que las mutaciones pueden continuar acumulándose después de la pérdida de expresión de la cadena pesada funcional.

Los artefactos de la PCR contribuyen muy poco a la base de datos de mutaciones; no solo es la prevalencia de sustituciones de nucleótidos en gran medida superior a la observada en las amplificaciones por PCR control ($<0,05 \times 10^{-3} pb^{-1}$), sino que también se encuentran clones mutados de forma idéntica (así como clones relacionados dinásticamente) en las amplificaciones independientes. En muchos casos, las generaciones dentro de un linaje difieren en una sustitución de un solo nucleótido, lo que indica que solo un pequeño número de sustituciones se ha introducido en cada ronda de mutación.

El análisis de los reordenamientos de V_λ revela que Ramos alberga un reordenamiento en el marco de $V_{\lambda 2,2-16}$ (como describen Chapman et al. 1996)) y un reordenamiento fuera del marco de $V_{\lambda 2,2-25}$. Existe una diversidad mutacional en ambas V_λ reordenadas, aunque se ha acumulado una diversidad mayor en el alelo no funcional (Figura 1C).

Una característica clásica de la hipermutación de anticuerpos es que las mutaciones se acumulan en gran medida en la región V pero apenas en C. Esto también es evidente en las mutaciones que se han acumulado en el locus de IgH de Ramos (Figura 1D). Los clones M13 que contienen insertos de ADNc que se extienden a través de V_H , $C_{\mu 1}$ y los primeros 87 nucleótidos $C_{\mu 2}$ se generan mediante PCR a partir del cultivo inicial de Ramos. Los gráficos por sectores (presentados como en la Figura 1A) representan la extensión de la mutación identificada en el tramo de 341 nucleótidos de V_H en comparación con un tramo de 380 nucleótidos de C_{μ} que se extiende desde el comienzo de $C_{\mu 1}$.

La inmunoglobulina IgM producida por Ramos está presente tanto en la superficie de las células como, en forma secretada, en el medio de cultivo. El análisis del medio de cultivo revela que Ramos secreta moléculas de inmunoglobulina a una concentración muy alta, de aproximadamente $1 \mu g/ml$. Por lo tanto, Ramos es capaz de secretar inmunoglobulinas a un nivel que hace innecesario rehacer los genes de inmunoglobulina en líneas celulares de expresión o bacterias para la producción.

Ejemplo 2: La diversificación de V_H en Ramos es constitutiva

Para abordar si la diversificación del gen V está en curso, las células se clonan y la diversidad de V_H se evalúa mediante un ensayo basado en MutS después de períodos de cultivo *in vitro*. La V_H de Ramos se amplifica por PCR y se purifica como se ha descrito anteriormente utilizando oligonucleótidos que contienen una base biotinilada en el extremo 5'. Después de la desnaturalización/renaturalización (99 °C durante 3 minutos; 75 °C durante 90 minutos), el grado de mutación se evalúa mediante el control de la unión del material heterodúplex con apareamientos erróneos a la proteína bacteriana de reparación de apareamientos erróneos MutS, unida al filtro, con detección mediante ECL como se ha descrito anteriormente (Jolly et al., 1997).

Los resultados indican que la diversificación de V_H está, de hecho, en curso (véase la Figura 2A). El ADN se extrae de las células de Ramos que se han cultivado durante 1 o 3 meses tras la clonación por dilución límite. La V_H reordenada se amplifica mediante PCR utilizando oligonucleótidos biotinilados antes de someter a la desnaturalización/renaturalización; a continuación, los heterodúplex con apareamientos erróneos se detectan mediante la unión a MutS inmovilizada como se ha descrito anteriormente (Jolly et al., 1997). Una parte alícuota del ADN renaturalizado se une directamente a membranas para confirmar de carga de ADN emparejado (control de ADN total). Los ensayos realizados en V_H de Ramos amplificado a partir de un molde de plásmido bacteriano, así como desde el cultivo inicial de Ramos se incluyen para la comparación.

Los genes de V_H se amplifican por PCR a partir de cultivos de Ramos que se han ampliado durante cuatro (Rc1) o seis (RC13 y 14) semanas (Figura 2B). Una tasa de mutación para cada clon se indica y se calcula dividiendo la prevalencia de las mutaciones de V_H independientes a las 4 o 6 semanas de la clonación por el posible número de divisiones celulares en base a un tiempo de generación de 24 horas. Las secuencias revelan acumulación de mutaciones escalonadas con una tasa de mutación de aproximadamente $0,24 \times 10^{-4}$ mutaciones pb^{-1} generaciones⁻¹.

La comparación directa de la tasa de mutación de V_H en Ramos con la de otras líneas celulares no es sencilla, ya que hay poca información sobre las tasas de mutación en otras líneas, como juzgan mutaciones no seleccionadas incorporadas a lo largo del V_H obtenido después de la expansión clonal a partir de una sola célula precursora. Sin embargo, la prevalencia de mutaciones tras una expansión de dos semanas 50s células BL2 precursoras se ha determinado en condiciones de inducción de mutaciones ($2,7 \times 10^{-3}$ mutaciones pb^{-1} ; Denépoux et al, 1997). Experimentos similares realizados con Ramos en condiciones de cultivo normal revelan una prevalencia de la mutación de $2,3 \times 10^{-3}$ mutaciones pb^{-1} . Varios intentos para mejorar la tasa de mutación mediante la provisión de citocinas, las células T colaboradoras etc., han resultado infructuosos. Por lo tanto, la tasa de mutación que se puede lograr mediante la inducción específica en células BL2 parece ser similar a la tasa constitutiva de la mutación de V_H en Ramos.

Ejemplo 3: Análisis de la naturaleza de las mutaciones de V_H en Ramos

Se crea una base de datos de acontecimientos mutacionales que combina los detectados en el cultivo inicial de Ramos (de 141 secuencias distintas) con los detectados en cuatro subclones que se han cultivado en varios experimentos sin selección específica (de otras 135 secuencias distintas). Esta base de datos se crea después de que los conjuntos individuales de secuencias se han reunido ensamblado en relaciones dinásticas (como se detalla en la leyenda de la Figura 1B) para asegurar que la expansión clonal de una célula mutada individual no conduce a un acontecimiento mutacional específico contado varias veces. En el presente documento se describe un análisis de esta base de datos compuesta de 340 acontecimientos mutacionales distintos y presumiblemente no seleccionados (200 contribuidos por el cultivo de Ramos inicial y 140 a partir de los subclones expandido); el análisis por separado de las poblaciones iniciales y de subclon produce conclusiones idénticas.

La inmensa mayoría de las mutaciones (333 de 340) son sustituciones de nucleótido único. Se observa un pequeño número de supresiones (4) y duplicaciones (3) pero no hay inserciones sin molde; estos acontecimientos se tratan más adelante. Solo hay cinco secuencias que presentaban sustituciones de nucleótidos en posiciones adyacentes; sin embargo, en tres de los cinco casos, la genealogía reveló que las sustituciones adyacentes se han incorporado secuencialmente. Por lo tanto, la creación simultánea de sustituciones de nucleótidos en posiciones adyacentes es un acontecimiento raro.

La distribución de las mutaciones a lo largo del V_H es altamente no aleatoria (véase la figura 3). Las sustituciones de bases que se producen de forma independiente se indican en cada posición de nucleótido. Las ubicaciones de CDR1 y 2 se indican. Las posiciones de los nucleótidos se numeran desde el extremo 3' del cebador de secuenciación, correspondiendo la posición del nucleótido +1 a la primera base del codón 7; los codones se numeran de acuerdo con Kabat. Las mutaciones indicadas en cursiva (posición de nucleótido 15, 193, 195 y 237) son sustituciones que se producen en un subclon mutado y han revertido la secuencia en dicha posición con respecto al consenso indicado.

El principal punto caliente se encuentra en los nucleótidos G y C del codón Ser82a, que se ha identificado previamente como un importante punto caliente mutacional intrínseco en otros genes de V_H ; Wagner et al., 1995; Jolly et al., 1996) y se adapta al consenso RGYW (Rogozin y Kolchanov, 1992; Betz et al., 1993) y se ajusta al consenso RGYW (Rogozin and Kolchanov, 1992; Betz et al., 1993). Mientras que el punto caliente mutacional intrínseco dominante en muchos genes de V_H está en Ser31, este codón no está presente en el consenso V_H de Ramos (o su homólogo de la línea germinal) que tienen Gly en esa posición. Las sustituciones de nucleótidos individuales muestran un marcado sesgo a favor de las transiciones (51 % en lugar del 33 % esperado aleatoriamente). También hay una preferencia sorprendente para apuntar a G y C, que representan el 82 % de los nucleótidos diana (Tabla 1).

Tabla 1. Preferencias de sustitución de nucleótidos de hipermutación en Ramos

Nucleótido parental	Frecuencia de la sustitución a				Total
	T	C	G	A	
T	–	3,9	1,2	3,0	8,1
C	17,4	–	12,6	4,8	34,8
G	7,2	15,9	–	24,0	47,1
A	2,4	1,8	5,7	–	9,9

Las sustituciones de nucleótido único se computaron sobre la cadena de codificación V_H y se expresan como el porcentaje del número total (333) de sustituciones de nucleótidos independientes, no seleccionadas identificadas.

Ejemplo 4: Selección de células hipermutantes por la pérdida de IgM

El análisis de las variantes de Ramos revela varias mutaciones que deben haber inactivado V_H (véase la Figura 1B) lo que sugiere que podría ser posible que las células pierdan la expresión de IgM, pero sigan siendo viables. Si este es el caso, la pérdida de la expresión de Ig sería un medio fácil para seleccionar una línea de células B hipermutante de forma constitutiva.

El análisis del cultivo de Ramos revela que contenía 8 % de células con IgM en la superficie. Dichas variantes de pérdida de IgM se generan durante el cultivo *in vitro*, de la siguiente manera. El cultivo Ramos de partida se transfecta con un plásmido pSV2neo, se diluye en placas de 96 pocillos y los clones que crecen en medio selectivo pueden expandirse. La citometría de flujo realizada sobre los clones expandidos seis meses después de la transfección original revela la presencia de variantes de pérdida de IgM, que constituyen el 16 % y el 18 % de las dos poblaciones clonales (Rc13 y Rc14) que se muestran en el presente documento (Figura 4A). El enriquecimiento por una única ronda de clasificación rinde subpoblaciones que contienen 87 % (Rc13) y 76 % (Rc14) de células negativas para IgM en la superficie. Después de la amplificación por PCR del gen de V_H reordenado en estas subpoblaciones, la secuenciación revela que el 75 % (Rc13) y el 67 % (Rc14) de los segmentos de V_H clonados contenía una mutación sin sentido (de terminación), de delección (del) o de duplicación (dup) dentro del tramo de V_H de 341 nucleótidos. El resto de los clones se designan de tipo salvaje (wt), aunque no se ha realizado ningún intento para discriminar posibles mutaciones de sentido erróneo inactivadoras de V_H . Los 4 delecciones y 3 duplicaciones identificadas en la población Rc13 son todas distintas, mientras que solo 4 mutaciones distintas representan las 7 secuencias Rc14 determinadas que alojan las delecciones. La naturaleza de las delecciones y las duplicaciones se presenta en la Figura 6: cada acontecimiento se nombra con una letra seguida de un número. La carta da la procedencia de la mutación (siendo A, B y C los transfectantes control de TdT⁻ clonados, D, E y F los transfectantes TdT⁺ y U significa acontecimientos identificados en el cultivo inicial, sin seleccionar de Ramos); el número indica la primera posición del nucleótido en la cadena de la secuencia. Los nucleótidos eliminados se especifican por encima de la línea y los nucleótidos añadidos (duplicaciones o inserciones que no están en el molde) por debajo de la línea; las sustituciones de un solo nucleótido están rodeadas por un círculo, especificándose la base nueva. Los segmentos duplicados de origen V_H están subrayados; las inserciones que no están en el molde están en negrita. Con varias delecciones o duplicaciones, el acontecimiento está flanqueado por un solo nucleótido de origen desconocido. Tales cambios flanqueantes bien podrían surgir por sustitución de nucleótidos (en lugar de por inserción no presente en el molde) y, por tanto, estos acontecimientos se agrupan por separado; la asignación de la sustitución de una sola base (rodeada por un círculo) en uno u otro extremo de la delección/duplicación es a menudo arbitraria.

Las células IgM⁻ se enriquecen en una sola ronda de clasificación antes de la amplificación por PCR y la clonación de sus segmentos V_H . Las secuencias ponen de manifiesto una gama considerable de mutaciones inactivadoras de V_H (o codones de de terminación o desplazamientos del) (Figura 4), aunque diversas mutaciones inactivadoras son incluso evidentes en las variantes de pérdida de IgM clasificadas después de solo 6 semanas de expansión clonal (véase la Figura 5). En la Figura 5^a, la expresión de TdT en tres pSV-pβG/TdT y tres transfectantes control de Ramos se comparan mediante análisis de transferencia Western de los extractos de proteínas nucleares "NALM6 (un linfoma de células pre-B humano positivo para TdT) y HMy2 (un linfoma de células B humano maduro negativo para TdT) proporcionó controles.

En la figura 5B, los gráficos por sectores se muestran representando los acontecimientos mutacionales independientes que dan lugar a variantes de pérdida de IgM. Las variantes IgM⁻ (que constituyen el 1-5 % de la población) se obtienen mediante la clasificación de los tres transfectantes TdT⁺ y tres transfectantes control TdT⁻ que se han cultivado durante 6 semanas tras la clonación. Las regiones V_H en las subpoblaciones clasificadas se amplifican por PCR y se secuencian. Los gráficos por sectores representan los tipos de mutaciones que dan lugar a la inactivación de V_H con los datos obtenidos de las subpoblaciones TdT⁺ y TdT⁻ IgM⁻ agrupadas por separado. Las abreviaturas son como en la Figura 4A, excepto que "ins" indica clones que contienen inserciones de nucleótidos que aparentemente no estaban en el molde. Los clones que contienen delecciones o duplicaciones junto con múltiples inserciones de nucleótidos que no estaban en el molde solamente están incluidos dentro del segmento "ins" del sector. Solo se computan de forma inequívoca los acontecimientos mutacionales distintos. Por lo tanto, de las 77 mutaciones de inactivación de V_H claras identificadas en las subpoblaciones de pérdida de IgM TdT⁺, se identifican 30 mutaciones distintas de codón de terminación; si los mismos codones de terminación se han creado de forma independiente dentro de la población de pérdida de IgM derivada de un solo transfectante de Ramos, se habría sido subrayado.

Los codones de terminación se crean en diversas posiciones (Figura 4B), pero no se encuentran al azar. La figura 4B resume la naturaleza de los codones de terminación observados en las poblaciones de pérdida de IgM Rc13 and Rc14. Al menos ocho acontecimientos mutacionales independientes producen las mutaciones sin sentido que representan 20 de 27 secuencias de V_H no funcionales en la base de datos de Rc13; un mínimo de diez acontecimientos mutacionales independientes dan las mutaciones sin sentido que representan 15 de las 22 secuencias de V_H no funcionales en la base de datos de Rc14. Los números entre paréntesis después de cada codón de terminación dan el número de secuencias en la base de datos portadoras del codón de terminación correspondiente, seguida del número de estas secuencias que son distintas, discriminadas sobre la base de mutaciones adicionales. El análisis de los codones de terminación en en las variantes de pérdida de IgM

seleccionadas de otras cuatro poblaciones clonales revela la creación de codones de terminación en otras cinco localizaciones dentro de V_H. En los datos obtenidos en seis experimentos independientes, la creación de codones de terminación se limita a 16 de los 39 sitios posibles; estando las secuencias de ADN en estos sitios preferidos sesgadas (en la cadena codificante o no codificante) hacia el consenso RGYW.

No es sorprendente que, mientras que las deleciones y las inserciones representan solo una pequeña proporción de las mutaciones en los cultivos no seleccionados de Ramos (véase anteriormente), hacen una contribución mucho mayor cuando la atención se centra en las mutaciones inactivadoras de V_H. Es notable que una gran proporción de las variantes de pérdida de IgM puede ser explicada por mutaciones de codón de terminación/ de desplazamiento del marco de lectura en la propia V_H. Esto apoya más la propuesta de que la hipermutación en Ramos está dirigida, preferentemente, al dominio V de inmunoglobulina, ciertamente más que el dominio C o, de hecho, otros genes (por ejemplo, la vaina Igα/Igβ) cuya mutación podría dar lugar a un fenotipo IgM⁻ de la superficie. También puede ser que la V_H de Ramos esté más frecuentemente dirigida a hipermutación que su V_λ reordenado de forma productiva, una conclusión apoyada por el patrón de mutaciones en el cultivo inicial (Figura 1C).

La selección de células mediante la detección de variantes de pérdida de Ig es particularmente útil cuando dichas variantes son capaces de revertir, es decir, de readquirir su capacidad para la expresión de Ig endógena. La dinastía se establecida anteriormente (Figura 1B) sugiere no solo que pueden surgir células de pérdida de IgM, sino que también podrían sufrir una mutación. Para confirmar esto, las variantes de pérdida de IgM clasificadas de Rc13 se clonan por dilución límite. Tres semanas después de la clonación, la presencia de variantes de inversión IgM⁺ en los subclones IgM⁻ se detectó mediante análisis de inmunofluorescencia citoplásmica de 5 x 10⁴ Células; se proporciona su prevalencia (Figura 4C). Estas variantes de inversión IgM⁺ se enriquecen después en una sola ronda de clasificación y las secuencias de V_H del variante IgM⁻ se compararon con las de sus descendientes de inversión IgM⁺.

La inmunofluorescencia citoplásmica de diez poblaciones clonales expandidas revela la presencia de variantes de inversión IgM⁺ con una prevalencia variable (de 0,005 % a 1,2 %; Figura 4C), lo que permite calcular una tasa de mutación de 1 x 10⁻⁴ mutaciones de pb⁻¹ generación⁻¹ mediante análisis de fluctuación. Esta es algo mayor que la tasa calculado por análisis directo de las mutaciones no seleccionadas (0,25 x 10⁻⁴ mutaciones pb¹ generación⁻¹; véase anteriormente), probablemente debido en parte a que los diferentes clones de pérdida IgM reversionen a diferentes tasas dependiendo de la naturaleza de la mutación de alteración. De hecho, la secuencia que rodea los codones de terminación en los derivados de pérdida de IgM de Rc13 revela que TAG32 se adapta bien al consenso RGYW (R = purina, Y = pirimidina y W = A o T; Rogozin y Kolchanov, 1992), que representa una gran proporción de los puntos calientes de mutaciones intrínsecas (Betz et al., 1993), mientras que TAA33 y TGA36 no (Figura 4D).

Ejemplo 5: Selección de una nueva actividad de unión a Ig

En experimentos diseñados para demostrar el desarrollo de nuevas afinidades de unión, se observa que la mayoría de los miembros de la línea celular de Ramos descrita a continuación expresan una molécula de IgM de membrana que se une anticuerpos antiidiotipo (anti-Id1 y anti-Id2), específicamente formuladas contra la IgM de superficie de Ramos. Sin embargo, unas pocas células conservan IgM en la superficie, aunque no logran unirse al anticuerpo antiidiotipo. Esto se debe a una alteración en la afinidad de unión en la molécula de IgM de la superficie, de tal manera que ya no se une al anticuerpo. Las células que expresan una IgM de superficie aunque no se pueden unir al anticuerpo se pueden seleccionar en una sola ronda de clasificación de celular de acuerdo con la invención.

Esto se demuestra mediante el aislamiento de los clones positivos para μ/negativos para id que han perdido la capacidad de unirse a anti-Id2 a pesar de la retención de una IgM de superficie, mediante ELISA. Los clones se secuenciaron y en seis clones independientes se encuentra que un residuo de V_H, K70, está mutado a N, M o R del siguiente modo:

Clon	Mutación	
2	K70N	AAG→AAC
	S77N	AGC→AAC
4	K70M	AAG→ATG
	S59R	AGT→AGG
9	K70N	AAG→AAC
	K70N	AAG→AAC
10	K70N	AAG→AAC
12	K70N	AAG→AAC
13	K70R	AAG→AGG

No se observaron mutaciones en la cadena ligera. Por lo tanto, es evidente que los mutantes se pueden seleccionar de la línea celular de Ramos en la que la molécula de Ig producida tiene una única variación de pares de bases con respecto al clon parental.

Haciendo uso de un anti-Id1, se aísla una población similar de células que retienen la expresión de la región constante Igh pero que han perdido la unión al anticuerpo antiidiotipo. Estas células se enriquecen mediante

clasificación por citometría de y la secuencia de V_H determinada (Figura 7). Esto revela seis mutaciones cuando se compara con la secuencia de consenso de la población de partida. Dos de estas mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos alrededor de CDR3 (R \rightarrow T en 95 y P \rightarrow H en 98). Por lo tanto, la selección de cambios más sutiles en la molécula de inmunoglobulina se puede detectar mediante ensayo de la pérdida de unión

En experimentos adicionales, las células hipermutantes de acuerdo con la invención se lavan, se resuspenden en PBS/BSA (10^8 células en 0,25 ml) y se mezclan con un volumen igual de PBS/BSA que contiene 10 % (v/v) de perlas magnéticas recubiertas de antígeno. En el presente experimento, se utilizan perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal). Después de la mezcla a 4 °C sobre un rodillo durante 30 minutos, las perlas se lavan tres veces con PBS/BSA, derribando cada vez las perlas con un imán y retirando las células no unidas, las células restantes se siembran después en placas de 96 pocillos y se expanden hasta 10^8 células antes de someterlas a una nueva ronda de selección. Se llevan a cabo múltiples rondas de expansión celular (acompañadas de hipermutación constitutiva continua) y se realiza la selección. Después de múltiples rondas de selección, la proporción de células que se unen a las perlas, que inicialmente está en o cerca de los niveles de fondo de 0,02 %, comienza a subir.

Después de 4 rondas, se observa enriquecimiento de células que se unen a estreptavidina. Esto se repite en la quinta ronda (Figura 8). La baja recuperación en porcentaje refleja la saturación de las perlas con las células, ya que el cambio de la relación célula:perla desde un gran exceso de 1:2 permite una recuperación de aproximadamente 20 % a partir de la quinta ronda de células de unión a estreptavidina (Figura 9). Esto demuestra el éxito de la selección de una nueva especificidad de unión de la línea celular de Ramos hipermutante, por cuatro rondas de selección iterativa.

La secuenciación de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de las células de unión a estreptavidina predice un cambio de aminoácido en la CDR3 de V_H y cuatro en la V_L (1 en FR1, 2 en CDR1 y 1 en CDR2) cuando se compara con la secuencia de consenso de la población de partida (figura 11).

Para asegurarse de que la unión de estreptavidina depende de la expresión de inmunoglobulina de superficie, las variantes negativas para inmunoglobulina de las células de unión a estreptavidina se enriquecen mediante clasificación por citometría. Esto reduce notablemente la recuperación de células de unión a estreptavidina con un exceso de perlas. Las células recuperadas por las perlas Dynal-estreptavidina de las células negativas clasificadas son, de hecho, positivas para Ig μ y, muy probablemente, representan la recuperación eficiente de células de unión a estreptavidina Ig μ que contaminan la población celular clasificada negativa para inmunoglobulinas.

Los datos preliminares sugieren que la eficiencia de la recuperación se reduce a medida que la concentración de estreptavidina en las perlas se reduce (Figura 9). Esto se confirma mediante el ensayo de la recuperación de células que se unen a estreptavidina con perlas incubadas con un intervalo de concentraciones de estreptavidina (Figura 10). El porcentaje de células recuperables a partir de una población de unión viene dictado por la relación entre las perlas y las células. En este experimento, la relación es de <1:1 perlas:células.

En una serie adicional de experimentos, se realizan otras dos rondas de selección, llevando el total a 7. Esto se logra mediante la reducción de la concentración de la estreptavidina unida a las perlas de 50 μ g/ml en la ronda 5 a 10 μ g/ml en la ronda 7. Aunque los niveles de secreción de IgM son comparable para las poblaciones seleccionadas en las rondas 4 a 7 (Figura 12), la unión a estreptavidina según se evalúa mediante ELISA está claramente y considerablemente aumentada en las rondas 6 y 7, en comparación con la ronda 4 (Figura 13).

Esto se confirma mediante la evaluación de la unión por resonancia de plasmón superficial en un chip BiaCore recubierto con estreptavidina (Figura 14). El sobrenadante de la ronda 7 se inyecta para que fluya a través del chip en el punto A, y se detiene en el punto B. En el punto C, se inyecta IgM antihumana, para demostrar que el material unido a la estreptavidina es IgM. El gradiente de A-B representa la constante de asociación, y el gradiente B-C la constante de disociación. A partir del trazado BiaCore, es evidente que el sobrenadante de la ronda 6 muestra características de unión superiores a las de los aislados de las poblaciones de la ronda 4 o las células de Ramos no seleccionadas.

Los anticuerpos de la ronda 6 del proceso de selección también muestran una unión mejorada con respecto a la ronda 4. La unión de las células de las selecciones de la ronda 6 a los agregados de estreptavidina-FITC, formados por preincubación del fluoróforo con una proteína biotinilada, se puede visualizar por FACS, como se muestra en la Figura 15. No se observa unión a las poblaciones de la ronda 4, células de Ramos no seleccionadas o de Ramos negativas a IgM, lo que indica la maduración de la unión a estreptavidina.

El uso de estreptavidina-FITC no agregada no produce resultados similares, y mayoría de las células de la ronda 6 no se unen. Esto, de acuerdo con los datos del ELISA, sugiere que la unión a estreptavidina se debe a la avidéz de la unión del anticuerpo a una matriz de antígeno, en lugar de a una afinidad monovalente. Se pueden aislar células de unión de mayor afinidad mediante la clasificación de la unión a estreptavidina-FITC no agregadas.

Con el fin de determinar las mutaciones responsables de la mayor unión vista en las células de la ronda 6 frente a las células de la ronda 4 células, los genes de las cadenas ligera y pesada de anticuerpo se amplifican por PCR, y después se secuencian. En comparación con las células de la ronda 4, no hay cambios en los genes de la cadena pesada, estando la mutación R103S conservada. En la cadena ligera, las mutaciones V23F y G24C también están conservadas, pero una mutación adicional está presente en la posición 46. Ramos de tipo salvaje tiene un aspartato en esta posición, mientras que las células de la ronda 6 tienen una alanina. Se predice que los cambios en esta posición afectan a la unión al antígeno, ya que los residuos en esta región contribuyen a la CDR2 de la cadena ligera (Figura 16). Parece probable que la mutación D46A sea responsable del aumento observado en la unión a estreptavidina que se ve en las células de la ronda 6.

Ejemplo 6: Construcción de transgén que comprende secuencias que dirigen hipermutaciones

Se sabe que ciertos elementos de loci del gen de Ig son necesarios para la dirección de los acontecimientos de hipermutación *in vivo*. Por ejemplo, se ha demostrado que el potenciador de intrón y la región de unión a la matriz Ei/MAR desempeñan un papel crucial (Betz *et al.*, 1994). Por otra parte, se sabe que el potenciador en 3' E3' es importante (Goyenechea *et al.*, 1997). Sin embargo, los inventores han demostrado que estos elementos, aunque necesarios, no son suficientes para dirigir la hipermutación en un transgén.

Por el contrario, la provisión de Ei/MAR y E3' junto con el ADN intrónico J_κ-C_κ y C_κ es suficiente para conferir hipermutabilidad. Un transgén βG-C_κ se ensambla uniendo un fragmento de 0,96 Kb de KpnI-SpeI β-globina generado por PCR (que se extiende desde -104 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción de β-globina a +863 y tiene sitios de restricción KpnI y SpeI artificiales en sus extremos) a un subfragmento de LκΔ[3'F1] [Betz *et al.*, 1994] que se extiende desde el nucleótido 2314 en la secuencia de Max *et al* [1981] a través de Ei/MAR, C_κ y E3', e incluye la delección 3'F1.

La hipermutación se evalúa mediante secuenciación de los segmentos del transgén que se amplifican por PCR utilizando la Pfu polimerasa. La región amplificada se extiende desde inmediatamente aguas arriba del sitio de iniciación de la transcripción a 300 nucleótidos aguas abajo de J_κ5.

Este transgén quimérico está bien dirigido para la mutación con sustituciones de nucleótidos que se acumulan a una frecuencia similar a la encontrada en un transgén normal de Igκ. Este transgén es el más pequeño descrito hasta ahora que recluta de manera eficiente la hipermutación y los resultados indican que múltiples secuencias localizadas en algún lugar de la región que incluye y flanquea C_κ se combinan para reclutar hipermutación al extremo 5' de la quimera β-globina/Igκ.

Por consiguiente, el reclutamiento de hipermutación puede estar dirigido únicamente por las secuencias situadas hacia el extremo 3' del dominio de hipermutación. Sin embargo, el extremo 5' del dominio de mutación en los genes de Ig normales en la proximidad del promotor, unos 100-200 nucleótidos aguas abajo del sitio de iniciación de la transcripción. Este posicionamiento del borde en 5' del dominio de mutación con respecto al sitio de iniciación se mantiene incluso en el transgén βG-C_κ cuando el gen de la β-globina proporciona tanto el promotor como la mayor parte del dominio de mutación. Estos resultados son consistentes con los hallazgos efectuados con otros transgenes que indican que es la posición del propio promotor lo que define el borde en 5' del dominio de mutación.

La explicación más simple para la forma en la que algunos, si no todos, elementos reguladores κ contribuyen al reclutamiento de la mutación es proponer que funcionan llevando un factor de cebado de la hipermutación sobre el complejo de iniciación de la transcripción. Por analogía con los estudios clásicos sobre potenciadores como elementos reguladores de la transcripción, los potenciadores de Igκ pueden funcionar como reguladores de la hipermutación en una posición y de forma independiente de la orientación. En efecto, los datos obtenidos con el transgén βG-C_κ junto con los resultados anteriores en los que E3' se desplazó más cerca de C_κ [Betz *et al.*, 1994] revelan que la actividad potenciadora de la de E3' no es ni especialmente sensible a su posición u orientación con respecto al dominio de mutación.

Ei/MAR normalmente se encuentra hacia el extremo 3' del dominio de mutación. Mientras que la delección de Ei/MAR reduce drásticamente la eficacia de la orientación mutacional, su restauración a una posición aguas arriba del promotor (y por lo tanto fuera de la región transcrita) da un rescate parcial de la mutación, pero aparentemente sin afectar a la posición del borde 5' del dominio mutacional. Se obtuvo una confirmación independiente de estos resultados en ratones transgénicos utilizando un segundo transgén, *tk-neo::C_κ*, en el que una unidad de transcripción *neo* (bajo el control del promotor HSV*tk*) se integra en el exón C_κ mediante direccionamiento génico en las células madre embrionarias [Zou, *et al.*, 1995]. En este ratón, tras la unión de V_κ-J_κ, la Igκ Ei/MAR está flanqueada a ambos lados por dominios de transcripción: el gen V aguas arriba y *tk::neo* aguas abajo. El gen *tk-neo* se amplifica por PCR a partir de células B del centro germinal clasificadas de ratones homocigotos para la inserción *neo*.

Para el inserto *tk-neo* en ratones *tk-neo::C_κ*, la región amplificada se extiende desde los residuos 607 a 1417 [según se numera en el plásmido pMCNeo (número de acceso en GenBank U43611)], y la secuencia de nucleótidos determinada a partir de la posición 629 a 1.329. La frecuencia de mutación de los reordenamientos VJ_κ endógenos

en ratones *tk-neo::C_k* se determina utilizando una estrategia similar a la descrita en Meyer *et al.*, 1996. Los reordenamientos *V_{Jk5}* endógenos se amplifican usando un cebador directo consenso *V_k* FR3 (GGACTGCAGTCAGGTTTCAGTGGCAGTGGG) y un oligonucleótido LkFOR [GonzálezGonzalez–Fernandez and Milstein, (1993) PNAS (USA) 90:9862–9866] que ceba el retorno desde aguas abajo del clúster *J_k*.

Aunque el nivel de mutación de la *tk-neo* es bajo y sin duda es menos eficiente como diana de la mutación que la región flanqueante 3' de los genes de *V_k* reordenados en la misma población de células, parece que, al igual que con genes *V* normales, el dominio de la mutación en el inserto génico *neo* comienza en un poco más de 100 nucleótidos aguas abajo del sitio de iniciación de la transcripción a pesar de que Ei/MAR está aguas arriba del promotor.

Por lo tanto, los transgenes capaces de dirigir la hipermutación en una línea celular hipermutante de manera constitutiva pueden construirse usando Ei/MAR, E3' y elementos reguladores como se define en el presente documento que se encuentran aguas abajo de *J_k*. Por otra parte, los transgenes se pueden construir mediante la sustitución o la inserción en genes *V* endógenos, como en el caso de los ratones *tk-neo::C_k* o por unión de una secuencia de codificación deseada al intrón *J_k*, como en el caso del transgén βG-Ck.

Referencias

- Adetugbo, K, Milstein, C, and Secher, D.S (1977). Molecular analysis of spontaneous somatic mutants. *Nature* 265, 299–304.
- Bahler, D.W. and Levy, R. (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: Evidence for antigen selection. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6770–6774.
- Bass, S., R. Greene, and J.A. Wells. (1990). Hormone Phage: An Enrichment Method for Variant Proteins With Altered Binding Properties. *Proteins*. 8, 309–314.
- Braeuninger, A., Küppers, R., Strickler, J.G., Wacker, H.–H., Rajewsky, K. and Hansmann, M.–L. (1997). Hodgkin and Reed–Sternberg cells in lymphocyte predominant disease represent clonal populations of germinal center–derived tumor B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9337–9342.
- Berek, C. and Milstein, C. (1988). The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol. Rev.* 105, 5–26.
- Betz, A.G., Neuberger, M.S. and Milstein, C. (1993). Discriminating intrinsic and antigen–selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol. Today* 14, 405–411.
- Betz, A. G., Milstein, C., Gonzalez–Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T. and Neuberger, M. S., *Cell* 1994. 77: 239–248.
- Bonfield, J.K., Smith, K.F. and Staden, R. (1995). A new DNA–sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23, 4992–99.
- Bruggemann, M., Radbruch, A. and Rajewsky, K. (1982). Immunoglobulin V region variants in hybridoma cells. I, Isolation of a variant with altered idiotypic and antigen binding specificity. *EMBO J.* 1, 629–634.
- Capizzi and Jameson, (1973) *Mutat. Res.* 17:147–8
- Chapman, C.J., Mockridge, C.I., Rowe, M., Rickinson, A.B. and Stevenson, F.K. (1995), Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity. *Blood* 85, 2176–2181.
- Chapman, C.J, Zhou, J.X., Gregory, C., Rickinson, A.B. and Stevenson F.K. (1996). VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intraclonal heterogeneity and a role for antigen selection. *Blood* 88, 3562–3568.
- Chapman, K.B. and Szostak, J.W. (1994) *Curr. op. Struct. Biol.*, 4, 618–622. Chui, Y.–L., Lozano, F., Jarvis, J.M., Pannell, R., and Milstein, C. (1995). A reporter gene to analyse the hypermutation of immunoglobulin genes. *J. Mol. Biol.* 249, 555–563.
- Clackson, T and Wells, J A. (1994) *Trends Biotechnol.* 12, 173–84. Coffino, P. and Scharff, M.D. (1971). Rate of somatic mutation in immunoglobulin, production by mouse myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 219–223.
- Cull, M.G., Miller, J.F. and Schatz, P.J. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1865–9.
- Denépoux, S., Razanajaona, D., Blanchard, D., Meffre, G., Capra, J.D., Banchereau, J and Lebecque, S. (1997). Induction of somatic mutation in a human B cell line *in vitro*. *Immunity* 6, 35–46.
- Drake, J.W. (1998) *Genetics* 148:1667–1686.
- Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) *Nature*, 346, 81822
- Gold, L., Polisky, B, Uhlenbeck, O. and Yarus, M. (1995) *Annu Rev Biochem*, 64, 763–97.
- Goossens, T., Klein, U. and Kiippers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogenic translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2463–2468
- Goyenechea, B., Klix, N., Yélamos, J., Williams, G. T., Riddell, A., Neuberger, M. S. and Milstein, C., *EMBO J.* 1997. 16, in the press.
- Green, N.S., Lin, M.M. and Scharff, M.D. (1998). Immunoglobulin hypermutation in cultured cells. *Immunol. Rev.* 162, 77–87.
- Green, R. and Szostak, J.W. (1992) *Science*, 258, 1910–5.
- Jain, R., Roncella, S., Hashimoto, S., Carbone, A., Franco di Celle, P., Foa, R., Ferrarini, M and Chiorazzi, N. (1994). A potential role for antigen selection in the clonal evolution of Burkitt's lymphoma. *J. Immunol.* 153, 45–52.
- Jolly, C.J., Klix, N. and Neuberger, M.S. (1997). Rapid methods for the analysis of immunoglobulin gene hypermutation: application to transgenic and gene targeted mice. *Nucleic Acids Res.* 25, 1913–1919.

- Jolly, C.J., Wagner, S.D., Rada, C.A., Klix, N., Milstein, C. and Neuberger, M.S. (1996). The targeting of somatic hypermutation. *Semin. Immunol.* 8, 159–168.
- Joyce, G.F. (1994) *Curr. op. Structural Biol.*, 4, 331–336.
- 5 Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J. and Mumford, D. (1975). An EBV negative cell line established from a American Burkitt lymphoma; receptor characteristics, EBV infectability and permanent conversion into EBV-positive sublines by *in vitro* infection, *Intervirology* 5, 319–334,
- Klix et al., (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:317–326.
- Lundberg, K.S., et al., (1991) *Gene* 108:1–6.
- Luria and Delbreck., (1943) *Genetics* 28:491–511
- 10 McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990) *Nature*, 348, 552–4.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W. and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BAL.B/c mice to influenza virus haemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3180–3184.
- 15 Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 9022–6.
- Matthias, et al., (1989) *NAR* 17, 6418.
- Max, E. E., Maizel, J. V. and Leder, P., *J. Biol. Chem.* 1981. 256: 5116–5120.
- Moore, M.J. (1995) *Nature*, 374, 766–7.
- Neuberger, M.S. and Milstein, C. (1995). Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 248–254.
- 20 Parham, P. (ed). (1998). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Immunological Reviews*, Vol. 162 (Copenhagen, Denmark: Munksgaard).
- Ratech, H. (1992). Rapid cloning of rearranged immunoglobulin heavy chain genes from human B–cell lines using anchored polymerase chain reaction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 260–263
- Rogozin, I.B. and Kolchanov, N.A. (1992). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 1171, 11–18.
- 25 Sharpe et al., (1991) *EMBO J.* 10:2139–2145,
- Smith, G.P. (1985) *Science*, 228, 1315–7. Tomlinson, I.M. (1997). V Base database of human antibody genes. Medical Research Council, Centre for Protein Engineering, UK, <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/> Tuerk, C. and Gold, L, (1990) *Science*, 249, 505–10.
- 30 Wabl, M., Burrows, P.D., von Gabain, A. and Steinberg, C.M. (1985). Hypermutation at the immunoglobulin heavy chain locus in a pre–B–cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 479–482.
- Wagner, SD, Milstein, C. and Neuberger, M.S. (1995) Codon bias targets mutation *Nature* 376, 732.
- Weill, J.–C. and Reynaud, C.–A. (1996). Rearrangement/hypermutation/gene conversion: when, where and why? *Immunol. Today* 17, 92–97.
- 35 Wilson, P.C., de Boutellier, O., Liu, Y.–J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D. and Pascual, V. (1998). Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J. Exp. Med.* 187, 59–70
- Wu, H., Pelkonen, E, Knuutila, S and Kaartinen M. (1995). A human follicular lymphoma B cell line hypermutates its functional immunoglobulin genes *in vitro*. *Eur. J. Immunol*, 25, 3263–3269.
- Wu, H, and Kaartinen, M., (1995) *Scand. J. Immunol.* 42:52–59.
- 40 Zhu, M., Rabinowitz, J.L., Green, N.S., Kobrin, B.J. and Scharff, M.D. (1995) A well–differentiated B cell line is permissive for somatic mutation of a transfected immunoglobulin heavy–chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2810–2814,
- Zou, X., Xian, J., Popov, A. V., Rosewell, I. R., Muller, M. and Brüggemann, M., *Eur, J. Immunol.* 1995. 25: 2154–62.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una célula eucariótica que expresa inmunoglobulina en un método *in vitro* de hipermutación constitutiva dirigida de una o más secuencias de ácido nucleico en la preparación y aislamiento de un producto génico que tiene una actividad deseada, en la que la una o más secuencias de ácido nucleico que codifican el producto génico están unidas operativamente a las secuencias control que dirigen la hipermutación somática directa del uno o más ácidos nucleicos que codifican el producto génico sin el requisito de estimulación externa para producir una o más secuencias de ácido nucleico mutadas, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico mutadas codifican un producto génico que tiene una actividad deseada.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula eucariota que expresa inmunoglobulina se utiliza para producir una población de células que expresan mutantes del producto génico.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se identifican una célula o células dentro de la población de células que expresan mutantes del producto génico.
- 20 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula o células dirigen la hipermutación somática a un locus del gen V endógeno.
- 25 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las secuencias control que dirigen la hipermutación se seleccionan de secuencias que se producen aguas abajo del clúster génico J.
- 30 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las secuencias control comprenden elementos Ei/MAR, Ck más regiones flanqueantes, y el potenciador E3'.
- 35 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la una o más secuencias de ácido nucleico unidas operativamente a secuencias control que dirigen la hipermutación somática es una secuencia de ácido nucleico exógeno insertada en la célula o células.
- 40 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la secuencia de ácido nucleico exógeno comprende una secuencia de codificación heteróloga unida operativamente a secuencias control que dirigen la hipermutación somática, en el que las secuencias control son homólogas a la célula o células.
- 45 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que una secuencia de codificación de la región V endógena se sustituye por la secuencia de ácido nucleico exógena.
- 50 10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el producto génico es una cadena pesada de inmunoglobulina y/o una cadena ligera de inmunoglobulina.
- 55 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el producto génico es una proteína de unión a ADN.
- 60 12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el producto génico es una enzima.
13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la actividad deseada es una actividad de unión o actividad enzimática.
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el producto génico es una cadena pesada de inmunoglobulina o una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una especificidad de unión alterada o una afinidad de unión alterada.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la inmunoglobulina es una molécula de IgM.
16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la célula eucariota que expresa inmunoglobulina es capaz de alterar una o más secciones específicas de las una o más secuencias de ácido nucleico sin el requisito de estimulación externa.
17. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que la célula eucariota que expresa inmunoglobulina deriva de un tipo de célula que hipermuta *in vivo*.
18. Uso de acuerdo con reivindicación 17, en el que la célula eucariota que expresa inmunoglobulina deriva de una célula de linfoma de Burkitt, una célula de linfoma folicular o una línea celular de linfoma de células grandes difuso.

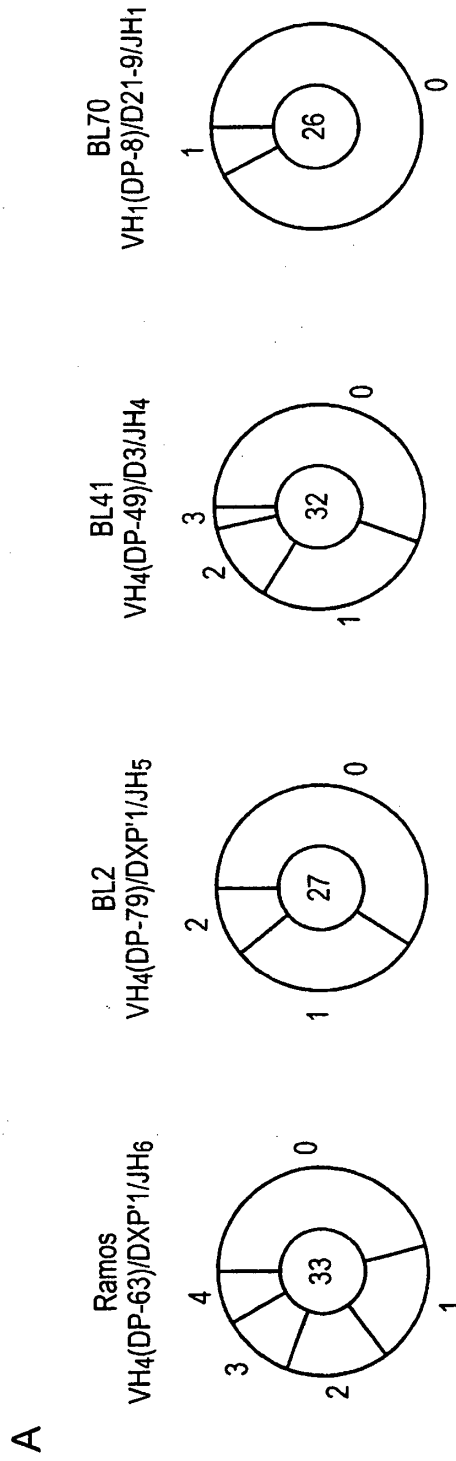


FIG. 1

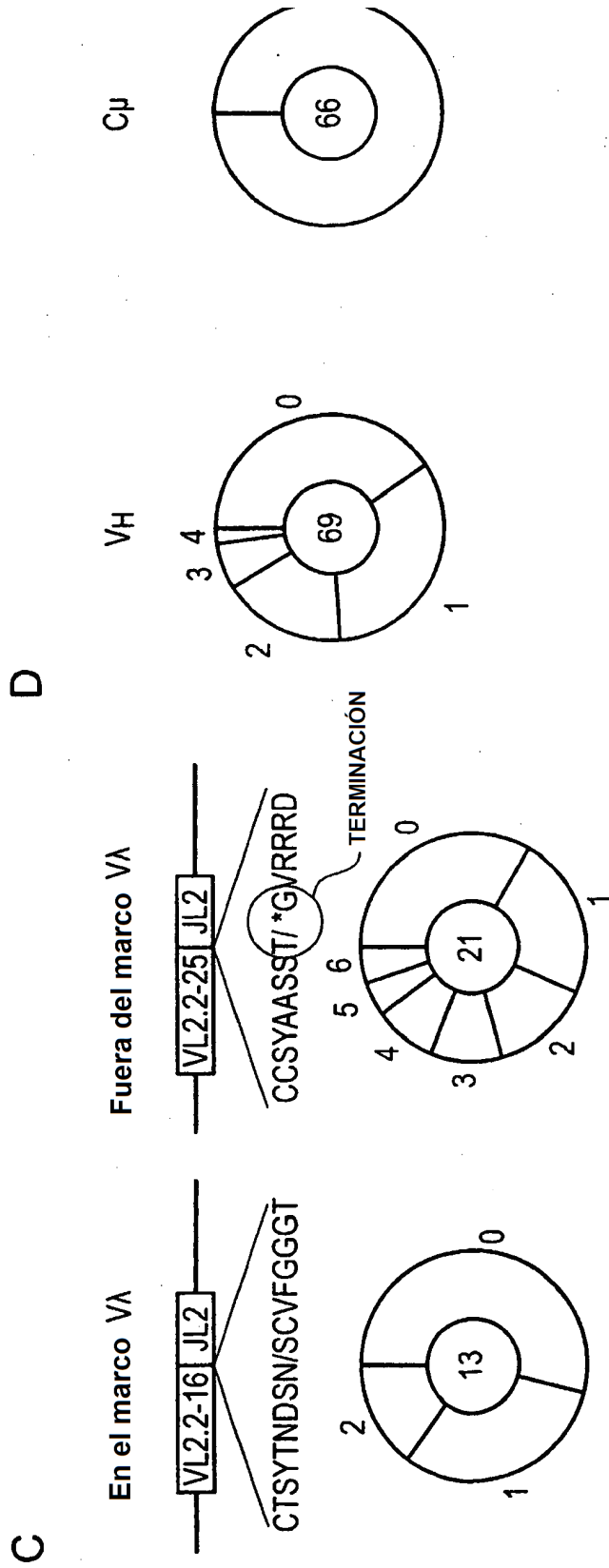


FIG. 1 CONT.

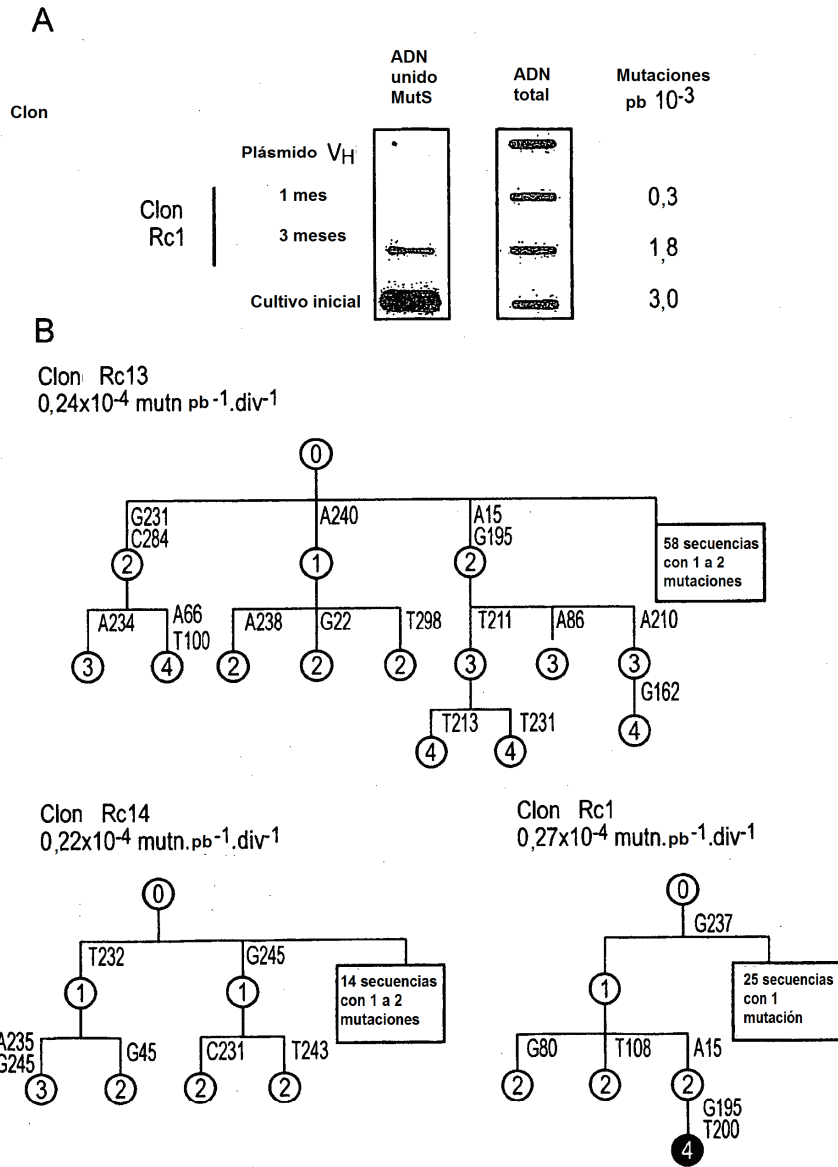


FIG. 2

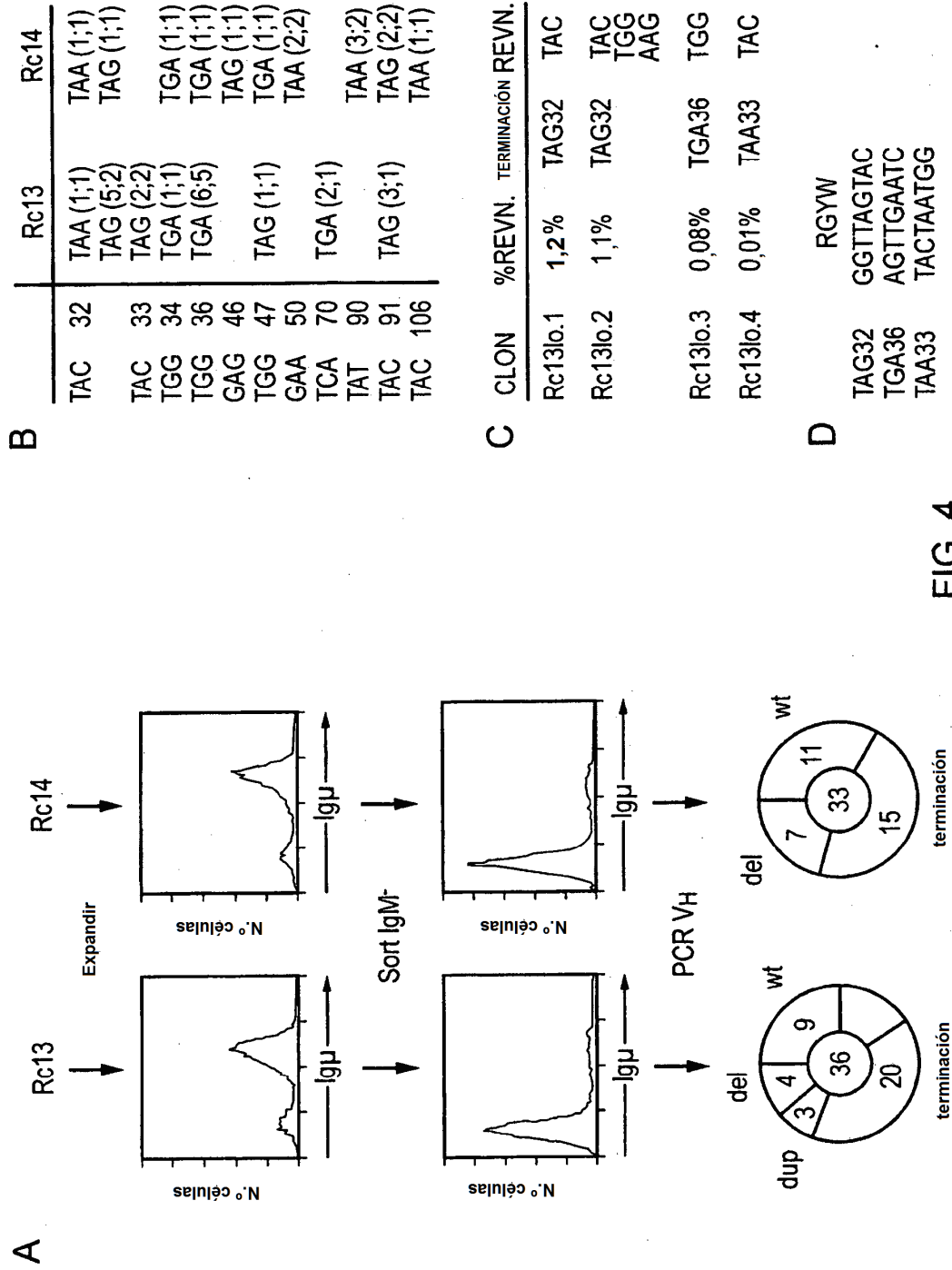


FIG. 4

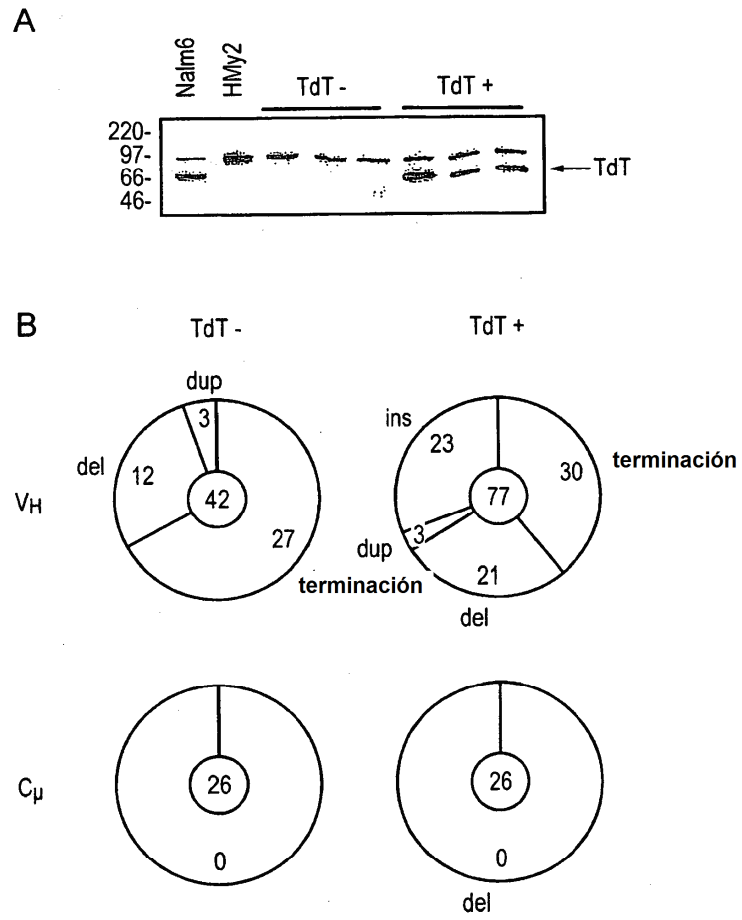


FIG. 5

TdT negativo	TdT positivo
<p>Delección</p> <p>A62 GGCCTTCAGTGGTTACTA A120 GTGGAT^TGGGGAA A276 TATTACTGTG.10bp.TACTAGGGCG A306 GAGGTA^CGGTATG B93 CCGCCA^GCCCCA B98 AGCCCC^AAGGGAA B227 TGAGCTCTGTG^AAACGCC C82 TGCAGT^TGGA.37bp.GAGTGGATTG C209 AGCACCTCTCCCTGAAGTTGAGCTC C187 ATATCAGTAGACACGTCCAAGAAGCACC U26 CGGAGAC^CCTGTCC U199 ACGTCCA^AAGCAC U208 AAGCAG^CTTTCTC U268 GCGAGA^GTTATTA^ACTAGGG</p> <p>Duplication</p> <p>A255 TGTGCGAGAGTTATTA^{CGAGACTTATTA}CTAGGG A113 GGCTGGAGTGGATTGGG.62bp.T ← <u>ATCAGTGGATTGGG.62bp.TATCAGTAGA</u></p> <p>U43 ACCTGCGGTGTTTAT^GGTGTTTAT^GGTGGG U318 GGACGTCTGGGTCCA^{ACGTCTGGGGCCA}AGGGAC</p>	<p>Delección</p> <p>D27 GGAGAC^CCTCACCTGCG D31 ACCCTCA^CCTGCG D219 CCTGAA^GTTGAGC D150 CACCAA^CTACAAC D109 AAGGGG^CTGGAGT E38 CCCTCAC^CTGCGGTGTT E81 CTGGAGTTGGA.37bp.TGGAGTGGATT E88 TGGATC^GCCAGCCCC E93 CCGCCA^GCCCCA E136 AATCATAGTGAAGCACTCAACTCAACCC F66 CTTCAGTGGTTACTACTGGAGTT F183 TATCATATCAGTA^ACACGT F215 TCTCC^TGAA.18bp.CGCCGCGGAC F267 TCGGAG^ATTATTA</p> <p>Duplication</p> <p>D55 TATGGTGG.41bp.AGGGGTGG.41bp.AGGGAAGG D123 GATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAA^{GCGGAA} ← <u>ATCAATCATAGGGAAGCACCAAC</u></p> <p>F85 AGTTGGAT.10bp.CCCAGGAT.10bp.CCCAGGGA</p>
Acontecimientos con sustituciones flanqueantes de un solo nucleótido	
<p>Delección</p> <p>B123 GATTGG^GAAAATC C109 AAGGCT^CTGGAGT</p> <p>Duplicación</p> <p>A16 TTGAAGCCTTCGGACT^IGAGCCTTCGGAGACCCTCT U180 AGTCA^CCCATATCAA^{ACCATATCAG}TAGACA</p>	<p>Delección</p> <p>D45 CTGCGCCGTTTATGGTGGGT^CCTTCA D164 CGTCCCCT^{CAAC}AGTGA D216 CTCCCTT^{AAG}.22bp.CGGACACGGC E11 GACTGT^TAAAGCC E54 TTATGGA^{GGG}.25bp.GTTGATCCG F188 TATCAGGAGACACGTCCAGAA^GCACCT F220 CTGAAGCTGAGCTCTGTG^AAACGCC</p>

FIG. 6

TdT positivo

Inserción (+/- Del/Dup)

D3 CCTCGC^AAGGACTGTGAAGC
CACCC

D56 ATGGTGGG.50pb CAGCGGGTGGG.50pb CAGGGAAGGGG

D71 GTGGTT^AGGGCTACTG

D75 TTAGT^CAGGTGGAGTT

D126 TGGGGA^{AAT}CAATCATAGTGA
GGG

D223 AAGTTG^{AG}GACCCCCCTCTGTG

D232 TCTGTGAACGCCGCGCCCCCGTCTGTGAACGCCGCGGACAC

D235 GTAAACGGAGGGCCGCG

D252 GGCTGTGTATTACTGTGCCAGA
TCC

D268 GCGAGA^{GT}AAGTATTATT

D275 TTATTAG^CGTAGGGC

D332 AAGGGA^CAGCAC

E3 GGGCCCAGGA.51bp.CTTCAGTGGT
GT

E51 TGTTTATGGT.15bp.TACTACTGGAG
AGACC

E80 ACTGGAC^GCCTTGGAT

E263 ACTGTGCGAGAGTTATTACTAGGGCG
GGTG

F89 GGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGG
AGG

F168 CCTCAAAGAGTCCAGTCACCAT
GGG

F195 AGACACGTCCAAGAAGCACCTC
AGGGC

F199 ACGTCC^{AAGAAG}ACCCTGA
CT

F242 CCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
GGA

F260 ATTACT^{GTG}CGTGACGAGAG

F264 CTGTGC^{GAGAG}.46bp.CGTCTGGGGC
ACA

FIG. 6 CONT.

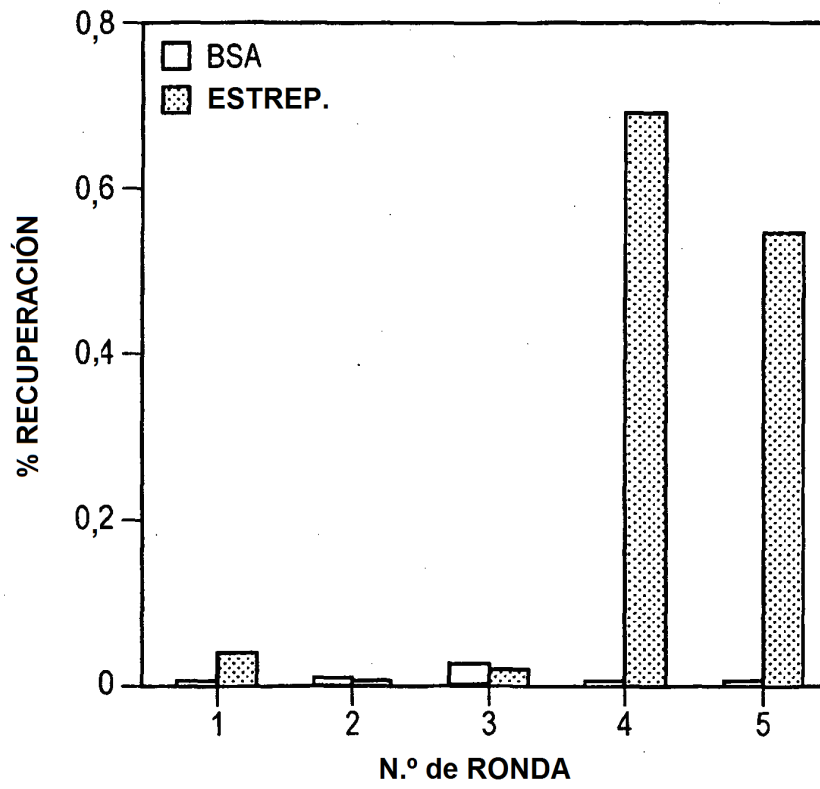


FIG. 8

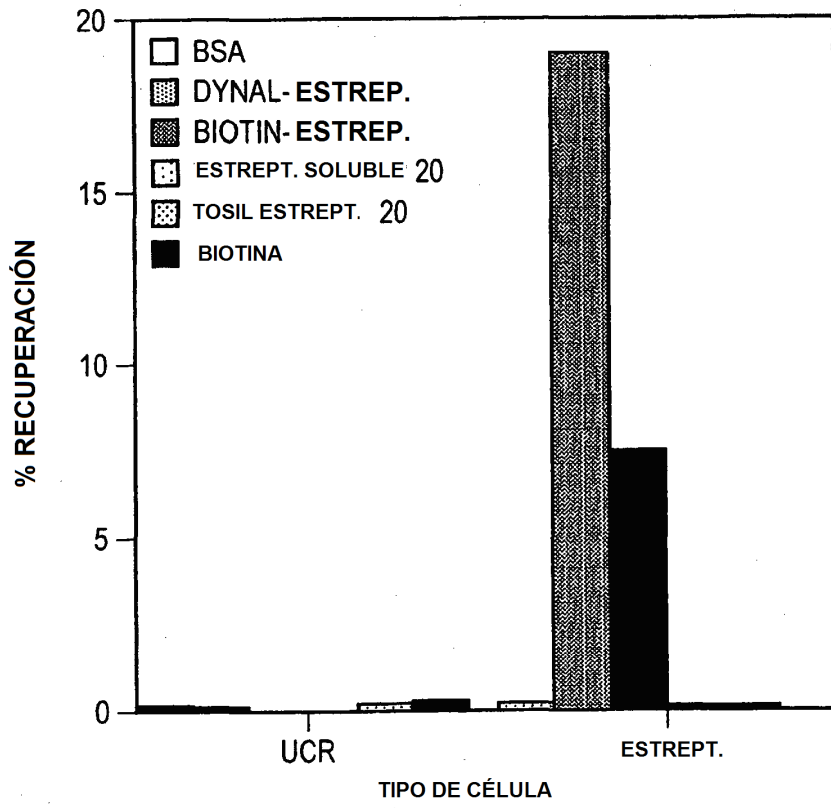


FIG. 9

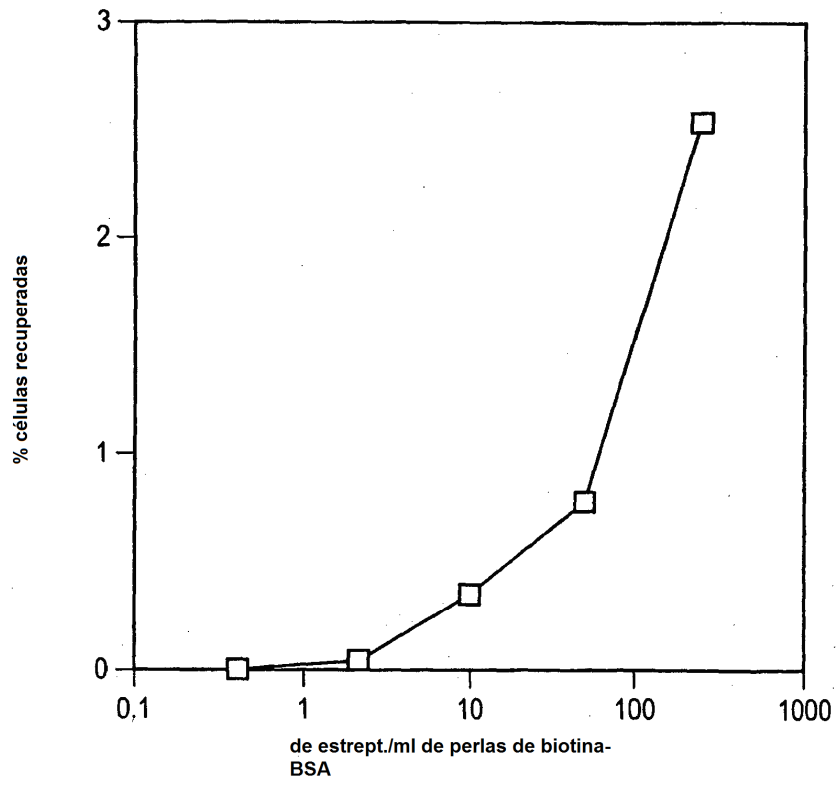


FIG. 10

VH
 1/1 31/11
 TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC GGT GTT TAT GGT
 W G A G L L K P S E T L S L T C G V Y G

61/21 91/31
 GGG TCC TTC AGT GGT TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG
 G S F S G Y Y TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG
 GGA AGT S W I R Q P P G K G L E
 G AGT S ATT I

121/41 151/51
 TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA
 W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R

181/61 211/71
 GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAG CAG CTC TCC CTG AAG TTG AGC TCT GTG AAC
 V T I S V D T S K K H L S L K L S S V N
 CAC AAC
 H N

241/81 271/91
 GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTT ATT ACT AGG GCG AGT CCT GCA ACA
 A A D T A V Y Y C A R V I T R A S P G T

301/101 331/111
 GAC GGG AGG TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
 D G R Y G M D V W G Q G T T
 AGC
 S

FIG. 11

VL
 1/1
 CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC
 P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S
 TAT
 Y
 31/11
 61/21
 AGT GAC GTT GGT GGT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA AAC CCA GGC AAA GCC CCC
 S D V G G Y N Y V S S W Y Q Q N P G K A P
 TTT TGT
 F C
 91/31
 121/41
 AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG ATT TCT AAT CGC TTC TCT GGC
 K L M I Y D V S N AAT
 N
 151/51
 181/61
 TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAC GAC GAG GCT
 S K S G N T A S L T I S G L Q A D D E A
 ATC
 I
 211/71
 241/81
 GAT TAT TAC TGC ACC TCA TAT ACA AAC GAC AGC AAT TCT CAG GTA TTC GGC GGA GGG ACC
 D Y Y C T S Y T N D S N S Q V F G G T
 ACT
 T
 271/91

FIG. 11 CONT'D

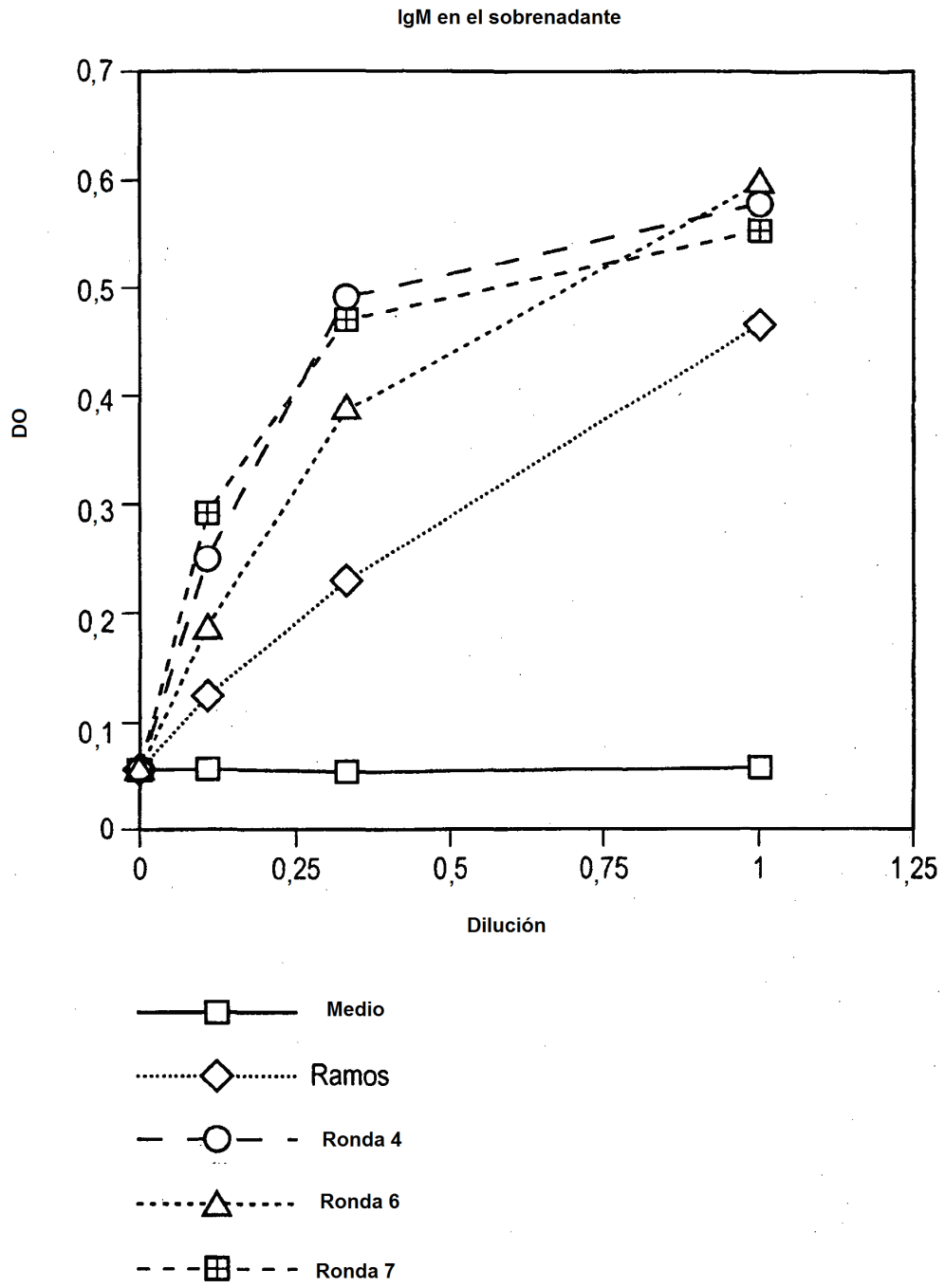


FIG. 12

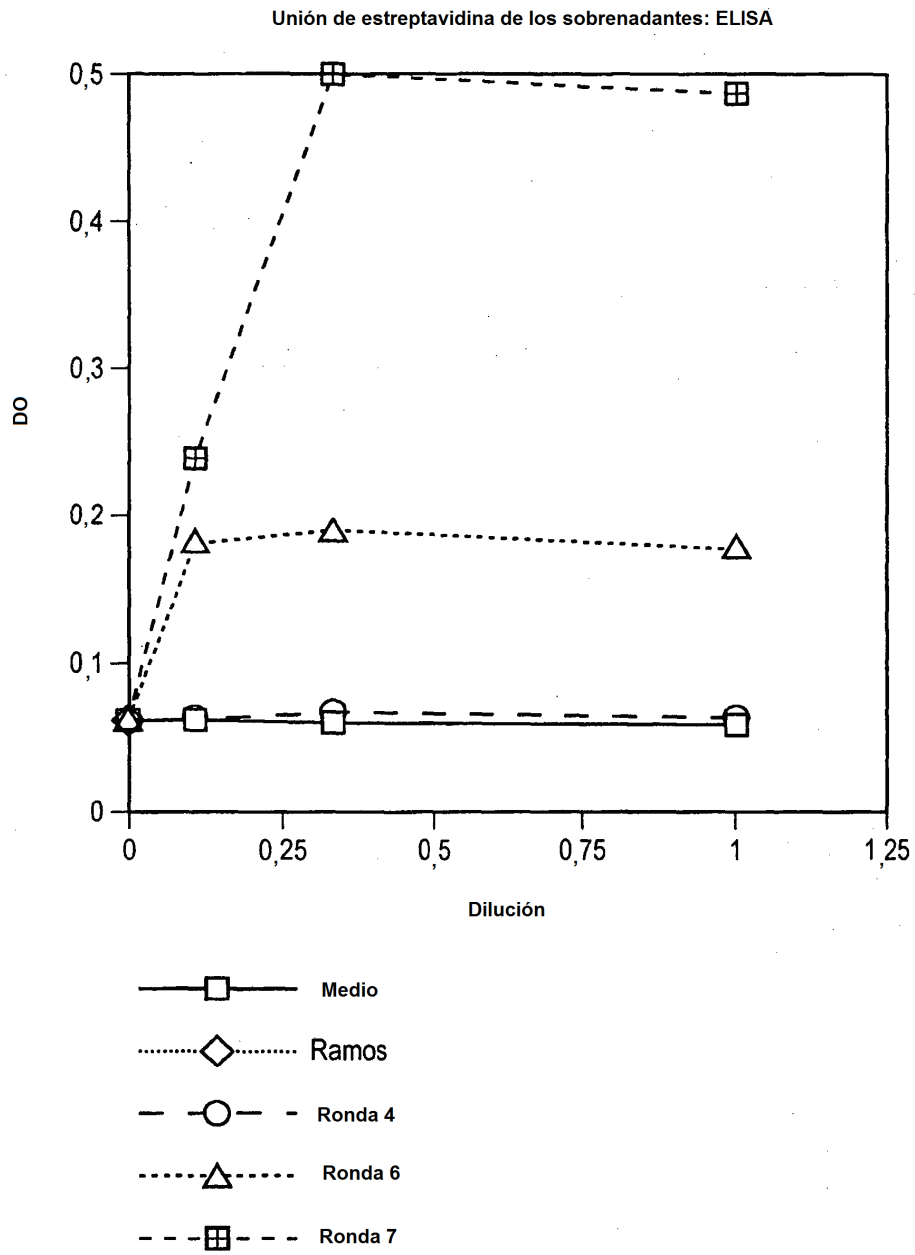


FIG. 13

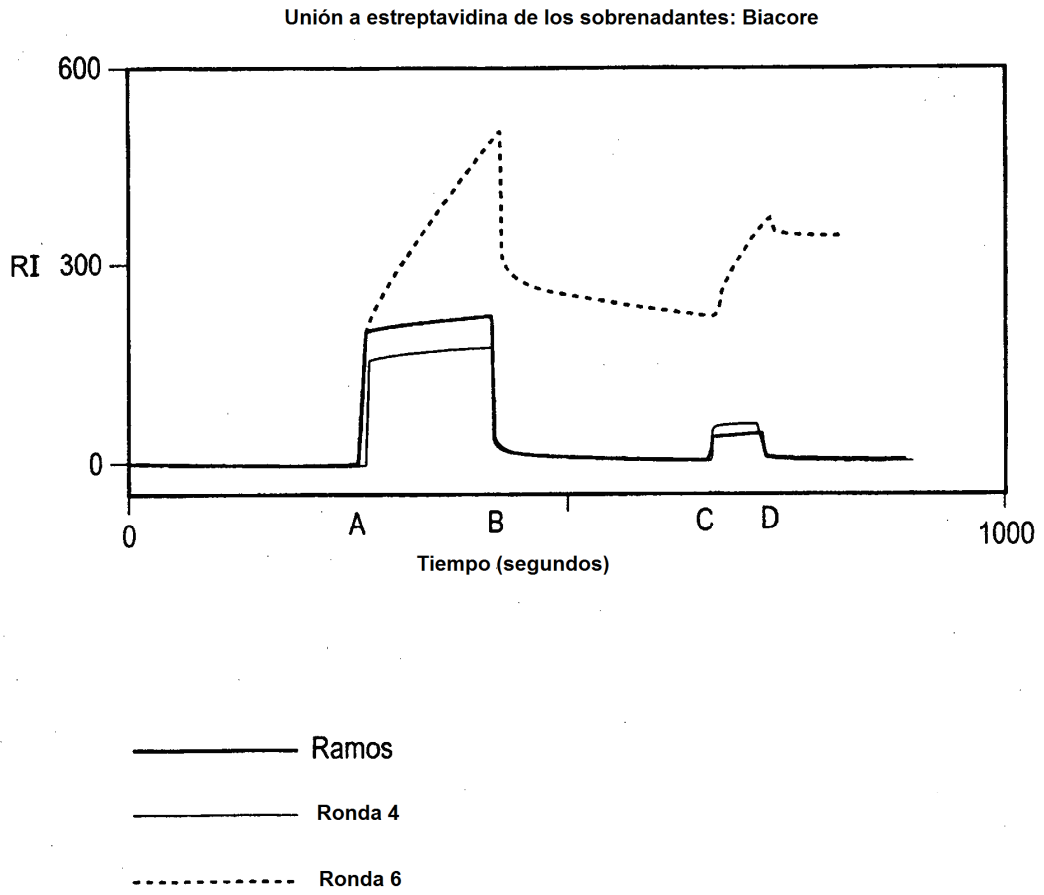


FIG. 14

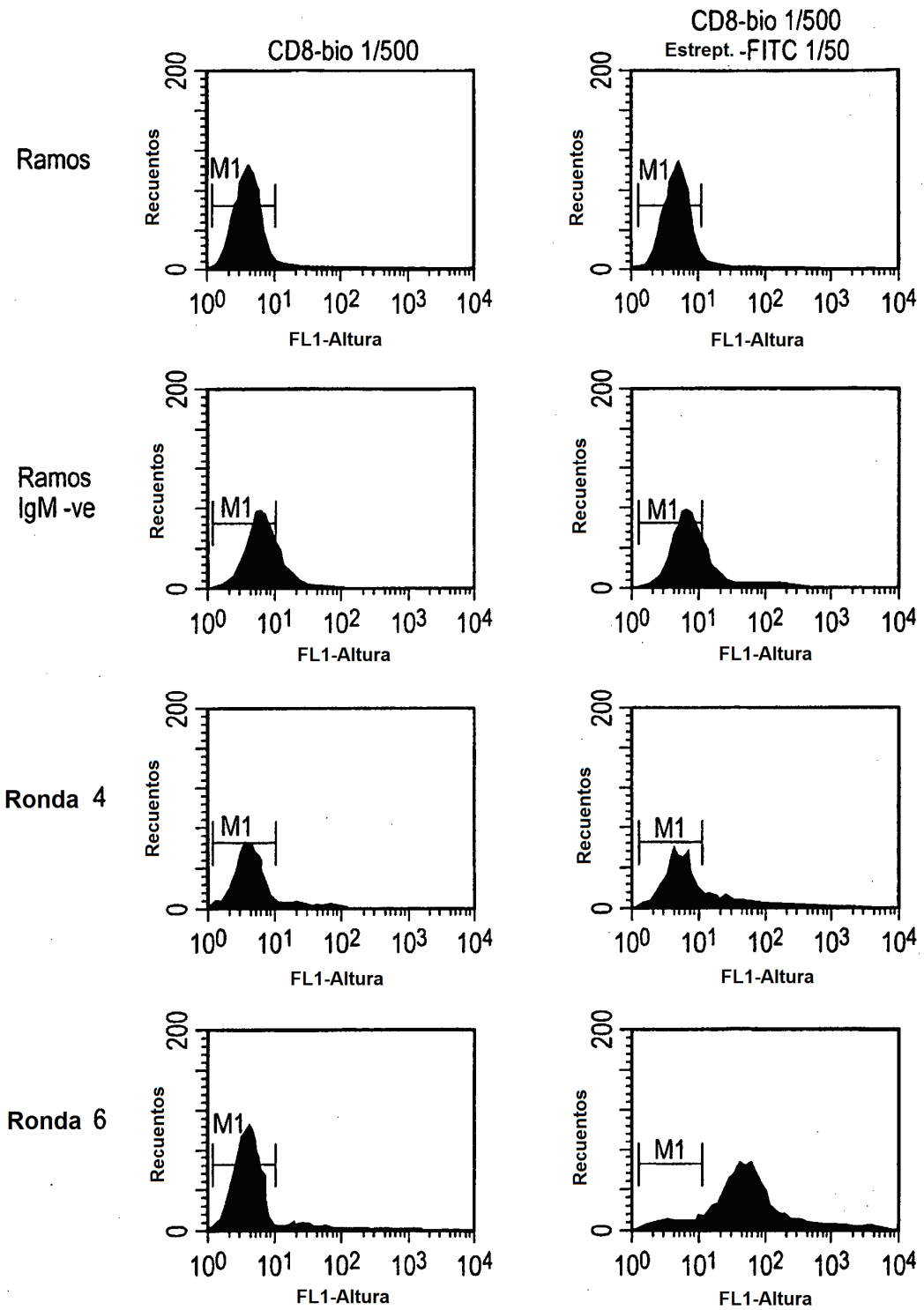


FIG. 15

VH
 1/1
 TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC GGT GTT TAT GGT
 W G A G L L K P S E T L S L T C G V Y G

31/11

61/21 CDR1 91/31
 GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG
 G S F S G Y Y W S W I R Q P P G K G L E

121/41 CDR2 151/51
 TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA
 W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R

181/61 211/71
 GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAG CAG CTC TCC CTG AAG TTG AGC TCT GTG AAC
 V T I S V D T S K K H L S L K L S S V N

241/81 DJ 271/91
 GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTT ATT ACT AGG GCG AGT CCT GCA ACA
 A A D T A V Y Y C A R V I T R A S P G T

301/101 331/111
 GAC GGG AGG TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
 D G R Y G M D V W G Q G T T
 AGC
 S

FIG. 16

