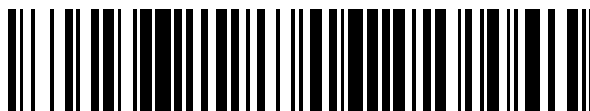


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 175**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G06F 19/16** (2011.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2011 PCT/US2011/027252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12009026**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2011 E 11807192 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2593797**

54 Título: **Nuevos métodos de evolución de proteínas**

30 Prioridad:

**16.07.2010 US 365216 P**

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

**10.02.2020**

73 Titular/es:

**BIOATLA, LLC (100.0%)  
11085 Torreyana Road, Suite 100  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SHORT, JAY, M.**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

**ES 2 741 175 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

Nuevos métodos de evolución de proteínas

## CAMPO DE LA INVENCION

5 En un aspecto particular, la presente invención es relevante para las proteínas y para su generación por la evolución de proteínas.

## ANTECEDENTES

10 La manipulación de proteínas a través de mutagénesis dirigida al sitio y, más recientemente, la evolución molecular se ha empleado con éxito para mejorar las propiedades enzimáticas en aplicaciones industriales y propiedades terapéuticas en anticuerpos. Las características tales como la termoestabilidad, el pH óptimo, la enantioselectividad, la especificidad y la afinidad de unión se han alterado para adaptar mejor las proteínas y anticuerpos para propósitos específicos.

15 Desde su creación, se han descrito y aplicado muchos métodos diferentes para la evolución molecular para mejorar las características de la proteína de destino. Por ejemplo, conjuntos de mutantes de un solo punto se pueden generar y cribar para mutantes mejorados. Las sustituciones de un solo aminoácido beneficiosas a continuación, se pueden recombinar y cribar para optimizar aún más las características deseadas en la molécula de destino. Held *et al.* ("*Comprehensive mutational analysis of the M13 major coat protein: improved scaffolds for C-terminal phage display*". *J. Mol. Biol.*, vol 340, páginas 587 a 597, 2004) revela un sistema de presentación de fagos con un péptido fusionado con el C terminal de la proteína principal de la cubierta del bacteriófago M13 (P8). Las bibliotecas de mutantes P8 se cribaron para seleccionar variantes que muestran el péptido con una alta eficiencia.

20 Lee *et al.* ("*High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold*", *J. Mol. Biol.*, Vol. 340, páginas 1073 a 1093, 2004) revela bibliotecas de anticuerpos sintéticos presentados en fagos construidas con un único marco humano por medio de la introducción de diversidad sintética en las posiciones expuestas por solvente dentro de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada. Los anticuerpos humanos de alta afinidad se pueden generar a partir de estas bibliotecas con regiones determinantes de complementariedad completamente sintéticas que se muestran en un solo andamio. Held y Sidhu, *J. Mol. Biol.*, Vol. 340, págs. 587 a 597 (2004) revela un método de análisis mutacional del terminal C de la proteína principal de la cubierta del bacteriófago M13 por medio de la generación de bibliotecas de mutantes que se muestran en una superficie bacteriana con alta eficiencia. Los mutantes se secuenciaron para compilar una base de datos comprensiva de diversas secuencias compatibles con el montaje en la cubierta del fago de tipo salvaje. Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.*, Vol. 340, págs. 1073 a 1093 (2004) describe un método para la producción de bibliotecas de anticuerpos sintéticos presentados en fagos con un único marco humano por medio de la introducción de diversidad sintética en las posiciones expuestas por solvente dentro de las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR, por su sigla en inglés). Mattos *et al.*, *Nature Biotechnology*, vol. 14, págs. 595 a 599 (1996) proporciona una revisión de los métodos utilizados para localizar y caracterizar los sitios de unión a ligandos sobre superficies de las proteínas, con un enfoque en un método denominado como "múltiples estructuras cristalinas de solvente" (MSCS, por su sigla en inglés). Se dice que este método de MSCS resuelve la estructura cristalina de rayos X de la proteína de destino en una variedad de solventes orgánicos. Cada tipo de molécula de solvente sirve como una sonda para los sitios de unión complementarios sobre la proteína de destino. Labriola-Tompkins *et al.*, PNAS, vol. 88, págs. 11182 a 11186 (1991) revela un método para la determinación de los aminoácidos que son esenciales para la unión de IL-1 $\beta$  con los tipos murinos I 1L-1R y II 1L-1R. El método selecciona ciertas posiciones en una región entre las posiciones 81 y 99 de la IL-1 $\beta$  como el objetivo de la mutagénesis para las mutaciones que producen proteínas mutantes que contiene cada uno una única sustitución de aminoácidos de uno de los siete aminoácidos que tienen una cadena lateral cargada en una de estas posiciones. Las proteínas mutantes se ensayan para determinar su capacidad para unirse a receptores IL-1 $\beta$  murinos por el uso de un ensayo de unión de inhibición competitiva.

45

50 Sin embargo, la evolución exitosa de una molécula de destino a partir de mutaciones puntuales individuales requiere que los cambios (algunas veces) sutiles en el rendimiento se puedan medir con precisión para identificar los mutantes mejorados. En los casos en los que no existe un ensayo sensible, las mutaciones de un solo punto no se pueden cribar con éxito. Se pueden hacer mutaciones simultáneas de varios sitios, sin embargo, el número de combinaciones creadas incrementa muy rápidamente y llega a los límites de la eficiencia de clonación y la capacidad de cribado.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos comprensivos de identificación y mapeo de polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un polipéptido plantilla. El método comprende (a) la generación de uno de: i. n-1

conjuntos separados de polipéptidos mutantes del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, cada conjunto comprende polipéptidos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada del polipéptido plantilla; en el que cada conjunto de polipéptidos mutantes se diferencia del polipéptido plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de polipéptidos mutantes diferentes generados es equivalente a  $(n-1) \times X$ , en el que  $X$  representa los 19 residuos de aminoácidos de origen natural que no están presentes en una posición dada del polipéptido plantilla; ii.  $n$  conjuntos separados de anticuerpos mutantes del polipéptido plantilla que es un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad en la que  $n$  es el número de aminoácidos en la por lo menos una región determinante de complementariedad, cada dicho conjunto comprende anticuerpos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada de dicha por lo menos una región determinante de complementariedad; en el que cada uno de dicho conjunto de anticuerpos mutantes se diferencia del anticuerpo plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos mutantes diferentes generados es equivalente a  $n \times X$ , en el que  $X$  representa los 19 residuos de aminoácidos de origen natural que no están presentes en una posición dada del polipéptido plantilla; iii.  $n-1$  o  $n-2$  en el caso en el que el residuo inicial sea metionina, polipéptidos mutantes separados del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, en el que cada polipéptido mutante se diferencia del polipéptido plantilla en que un aminoácido se elimina en sólo una única posición predeterminada; y iv.  $20 \times (n-1)$  polipéptidos mutantes separados del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, en el que cada polipéptido mutante se diferencia del polipéptido plantilla en que ha insertado después de una posición específica en la plantilla sólo uno de cada uno de los 20 aminoácidos de origen natural; (b) el ensayo de cada polipéptido mutante en los pasos I, III o IV, o cada anticuerpo mutante en el paso ii, para por lo menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; (c) para cada polipéptido mutante en los pasos I, III o IV, o cada anticuerpo mutante en el paso ii la identificación de cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla; y (d) la creación de un mapa funcional que se utiliza para identificar (1) posiciones y mutaciones que no afectan a dicha propiedad, característica o actividad del polipéptido o anticuerpo mutante en comparación con el polipéptido plantilla; (2) un sitios completamente mutables en comparación con el polipéptido plantilla; y (3) las posiciones y las mutaciones que dan como resultado un polipéptido mutante con una mejora de dicha propiedad, característica o actividad en comparación con el polipéptido plantilla y la mejora se selecciona de la reducción de la agregación de proteína-proteína, la mejora de la estabilidad de proteínas, el incremento de la solubilidad de proteínas, el incremento de la estabilidad del pH de proteínas, el incremento de la estabilidad de la temperatura de proteínas, el incremento de la estabilidad del solvente de proteínas, el incremento de la selectividad, la disminución de la selectividad, la introducción de sitios de glicosilación, la introducción de sitios de conjugación, la reducción de la inmunogenicidad, la mejora de la expresión de proteínas, el incremento de la afinidad por el antígeno, la disminución de la afinidad por el antígeno, un cambio en la afinidad de unión, un cambio en la inmunogenicidad, un cambio en la actividad catalítica, la optimización del pH, y la mejora de la especificidad.

En la alternativa, el método comprende la generación de una única población que comprende los conjuntos de polipéptidos mutados. En esta forma de realización, toda la población se secuencian, se prueba para la expresión y se criba para una función, los miembros individuales identificados, y, con preferencia, el mapa funcional generado.

Se utiliza cada aminoácido de origen natural, y  $X$  será 19 (que representa los 20 residuos de aminoácidos de origen natural y se excluye el residuo particular presente en la única posición predeterminada del polipéptido plantilla).

En una forma de realización, todo el polipéptido se somete a mutagénesis comprensiva. En otra forma de realización, una o más regiones se seleccionan para la mutagénesis comprensiva. En tal caso,  $n$  representa un subconjunto o región del polipéptido plantilla. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, el anticuerpo completo o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo se someten a mutagénesis comprensiva.

Para los anticuerpos, la propiedad, característica o propiedad predeterminada puede ser afinidad de unión y/o inmunogenicidad. De acuerdo con lo expuesto con anterioridad, en la alternativa se puede generar una única población que comprende todos los conjuntos de anticuerpos mutados.

Los anticuerpos mutantes se pueden formar a partir de un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR), la por lo menos una CDR consiste en  $n$  residuos de aminoácidos, el método comprende: (a) la generación de  $n$  conjuntos separados de anticuerpos, cada conjunto comprende anticuerpos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada de la CDR; en el que cada conjunto de anticuerpos mutantes se diferencia del anticuerpo plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos mutantes diferentes generado es equivalente a  $n \times X$ . En otra forma de realización, el anticuerpo comprende seis CDR, y juntas las CDR consisten en  $n$  residuos de aminoácidos.

Una forma de realización de la revelación incluye un mapa posicional funcional (EvoMap™) hecho por los métodos descritos en la presente memoria.

En una forma de realización adicional, ciertos residuos en particular sensibles al cambio se pueden indicar de este modo en el EvoMap™. Una optimización adicional se puede implementar por medio de la realización de cambios mutacionales adicionales en las posiciones fuera de estas posiciones sensibles.

5 En una forma de realización específica, las mutaciones generadas en las técnicas de evolución comprensiva de la revelación se confirman por medio de secuenciación, o algún otro método.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra cómo se utiliza la evolución posicional comprensiva (CPE™) para generar una base de datos específica de la molécula (EvoMap™).

10 La Figura 2 muestra un ejemplo de un EvoMap™ y cómo se puede implementar la optimización adicional por medio de evolución Synergy.

La Figura 3 muestra los niveles de expresión de IgG de longitud completa derivados de una biblioteca variante de codones Fc en comparación con el nivel de expresión de la IgG de tipo salvaje de la misma línea celular de mamífero.

15 La Figura 4 muestra un esquema de la evolución de Inserción Posicional Comprensiva (CPI™, por su sigla en inglés).

La Figura 5 ilustra una combinación de métodos de evolución: un ácido nucleico alargado de la evolución CPI™ se somete a Evolución Posicional Comprensiva (CPE™) y se utiliza para generar una base de datos específica de la molécula (EvoMap™).

20 La Figura 6 muestra un esquema de la evolución de Supresión posicional Comprensiva (CPD™, por su sigla en inglés).

La Figura 7 ilustra otra combinación de métodos de evolución: un ácido nucleico acortado de la evolución de CPD™ se somete a Evolución Posicional Comprensiva (CPE™) y se utiliza para generar una base de datos específica de la molécula (EvoMap™).

25 La Figura 8 muestra un esquema de Síntesis Posicional Comprensiva (CPS™, por su sigla en inglés) que se puede utilizar para combinar mutantes mejorados de CPE™.

La Figura 9 muestra un esquema de un EvoMap™ tridimensional hipotético.

## DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Con el fin de facilitar la comprensión de los ejemplos proporcionados en la presente memoria, se describirán ciertos métodos y/o términos que aparecen con frecuencia.

30 El término “agente” se utiliza en la presente memoria para denotar un polipéptido, una mezcla de polipéptidos, un conjunto de compuestos localizados espacialmente (por ej., una matriz de VLSIPS péptido, una matriz de polinucleótido, y/o una matriz combinatoria de moléculas pequeñas), una macromolécula biológica, una biblioteca de presentación de péptidos bacteriófagos, una biblioteca de presentación de anticuerpos bacteriófagos (por ej., scFv), una biblioteca de presentación de péptidos en polisomas, o una forma de extracto hecho de materiales biológicos  
35 tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos de animales (en particular de mamíferos). Los agentes se evalúan para su actividad potencial como antineoplásicos, antiinflamatorios o moduladores de la apoptosis por medio de su inclusión en ensayos de selección descriptos a continuación. Los agentes se evalúan para su actividad potencial como inhibidores de la interacción de proteínas específicas (es decir, un agente que inhibe de manera selectiva una interacción de unión entre dos polipéptidos predeterminados pero que no interfiere sustancialmente  
40 con la viabilidad celular) por medio de la inclusión en los ensayos de detección descriptos a continuación.

El término “aminoácido” de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria se refiere a cualquier compuesto orgánico que contiene un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ); con preferencia o bien como grupos libres o, de manera alternativa, después de la condensación como parte de enlaces peptídicos. Los “veinte alfa-aminoácidos formadores de polipéptidos codificados de forma natural” se entiende en la técnica y se refieren a:  
45 alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), ácido glutámico (Glu o E), glutamina (Gln o Q), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o y) y valina (Val o V).

El término “amplificación” significa que se incrementa el número de copias de un polinucleótido.

El término “anticuerpo”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina intactas, así como también fragmentos de moléculas de inmunoglobulina, tales como fragmentos Fab, Fab'(Fab')<sub>2</sub>, Fv, y SCA, que son capaces de unirse a un epítipo de un antígeno. Estos fragmentos de anticuerpo, que retienen cierta capacidad para unirse de manera selectiva a un antígeno (por ej., un antígeno de polipéptido) del anticuerpo del que se derivan, se pueden hacer por el uso de métodos muy conocidos en la técnica (véase, por ej., Harlow y Lane, supra), y se describen de manera adicional, de la siguiente manera. Los anticuerpos se pueden utilizar para aislar cantidades preparativas de antígeno por medio de cromatografía de inmunoafinidad. Varios otros usos de tales anticuerpos son para diagnosticar y/o enfermedades en etapas (por ej., neoplasia) y para la aplicación terapéutica para tratar la enfermedad, tal como, por ejemplo: la neoplasia, una enfermedad autoinmune, SIDA, enfermedades cardiovasculares, infecciones, y similares. Los anticuerpos quiméricos, similares a humanos, humanizados o totalmente humanos son en particular útiles para la administración a pacientes humanos.

Un fragmento Fab consiste en un fragmento monovalente de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, y se puede producir por medio de la digestión de una molécula de anticuerpo completo con la enzima papaína, para dar un fragmento que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada.

Un fragmento Fab' de una molécula de anticuerpo se puede obtener por medio del tratamiento de una molécula de anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo tratada de esta manera.

Un fragmento (Fab')<sub>2</sub> de un anticuerpo se puede obtener por medio del tratamiento de una molécula de anticuerpo completo con la enzima pepsina, sin reducción posterior. Un fragmento (Fab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab', mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro.

Un fragmento Fv se define como un fragmento manipulado genéticamente que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada expresadas como dos cadenas.

Un anticuerpo de cadena sencilla (SCA, por su sigla en inglés) es una molécula de cadena sencilla manipulada genéticamente que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada, unidas por un revestimiento de polipéptido flexible adecuado.

El término “biosimilar”, también denominado “de continuación biológica”, se refiere a nuevas versiones oficialmente aprobadas de productos biofarmacéuticos innovadores, luego de la expiración de las patentes o la exclusividad.

El término “huésped de producción de células”, o “huésped de fabricación”, se refiere a una línea celular utilizada para la producción o fabricación de proteínas. Las células eucariotas tales como células de mamífero, que incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares humanas, ratón, hámster, rata, mono, así como también líneas celulares de levaduras, insectos y plantas. De manera alternativa, se pueden utilizar células procariotas. En un aspecto, un huésped de producción de células de mamífero se selecciona de un miembro del grupo que consiste en células de fibroblastos 3T3 de ratón; células de fibroblastos de hámster sirio BHK21; MDCK, células epiteliales de perro; células epiteliales humanas Hela; células epiteliales de rata y canguro PtK1; células plasmáticas de ratón SP2/0; y células de plasma de ratón y ratón NS0; células de riñón embrionario humano HEK 293; células de riñón de mono COS; células de ovario de hámster chino CHO, CHO-S; células embrionarias de ratón R1; células embrionarias de ratón E14.1; células embrionarias humanas H1; células embrionarias humanas H9; células embrionarias humanas PER C.6. En otro aspecto, el huésped de producción celular es una línea celular GS-NS0 o GS-CHO-K1. En otro aspecto, el huésped de producción de células se selecciona de células de levadura *S. cerevisiae*; y células de levadura *Picchia*. En otro aspecto, el huésped de producción celular es una línea celular bacteriana.

Una molécula que tiene una “propiedad quimérica” es una molécula que es: 1) en parte homóloga y en parte heteróloga a una primera molécula de referencia; mientras que 2) al mismo tiempo de ser en parte homóloga y en parte heteróloga a una segunda molécula de referencia; sin 3) excluir la posibilidad de ser al mismo tiempo en parte homóloga y en parte heteróloga a todavía una o más moléculas de referencia. En una forma de realización no limitante, una molécula quimérica se puede preparar por medio del ensamblaje de una recombinación de secuencias moleculares parciales. En un aspecto no limitante, una molécula de polinucleótido quimérico se puede preparar por medio de la síntesis del polinucleótido quimérico por el uso de pluralidad de plantillas moleculares, de manera tal que el polinucleótido quimérico resultante tenga propiedades de una pluralidad de plantillas.

El término “análogo” de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, se refiere a una secuencia de gen que está evolutivamente y funcionalmente relacionada entre especies. Por ejemplo, pero sin limitación, en el genoma humano, el gen CD4 humano es el gen cognado al gen 3D4 de ratón, dado que las secuencias y estructuras de estos dos genes indican que son altamente homólogos y ambos genes codifican una proteína que funciona en la

señalización activación de las células T a través del reconocimiento del antígeno MHC restringido de clase II.

El término “escala comercial” significa la producción de una proteína o anticuerpo a una escala apropiada para su reventa.

5 Una “ventana de comparación”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de por lo menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en el que una secuencia de polinucleótidos se puede comparar con una secuencia de referencia de por lo menos 20 nucleótidos contiguos y en la que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede llevar a cabo por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Maths.* 2: 482 por medio del algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wuncsch *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por medio de la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 85: 2444 (1988), por medio de implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por medio de inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “región determinante de complementariedad” y “CDR” se refiere al término reconocido en la técnica de acuerdo con lo ejemplificado por Kabat y Chothia. Las definiciones de CDR también se conocen por lo general como regiones supervariables o bucles hipervariables (Chothia y Leks, 1987; Chothia *et al.*, 1989; Kabat *et al.*, 1987; y Tramontano *et al.*, 1990). Los dominios de región variable de manera típica comprenden la amino-terminal aproximadamente 105 a 115 aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina de origen natural (por ej., aminoácidos 1 a 110), si bien los dominios variables un tanto más cortos o más largos también son adecuados para la formación de anticuerpos de cadena sencilla. Las CDR son las partes de inmunoglobulinas que determinan la especificidad de dichas moléculas y hacen contacto con un ligando específico. Las CDR son la parte más variable de la molécula y contribuyen a la diversidad de estas moléculas. Hay tres regiones CDR: CDR 1, CDR 2 y CDR 3 en cada dominio V. CDR-H representa una región CDR de una cadena pesada variable y CDR-L se refiere a una región CDR de una cadena ligera variable. H significa la cadena pesada variable y L significa la cadena ligera variable. Las regiones CDR de una región derivada de Ig se pueden determinar de acuerdo con lo descrito en Kabat (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta edición, NIH Publication Núm. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, Chothia (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901 a 917 y Chothia (1989) *Nature*, 342, 877 a 883.

El término “comprensivo/a” se utiliza en la presente memoria para referirse a una técnica de evolución, en la que cada cambio posible se hace en cada posición de un polinucleótido plantilla o polipéptido plantilla y el polinucleótido o polipéptido se prueba para confirmar el cambio previsto se ha hecho por medio de secuenciación o alguna otra técnica. La mutagénesis comprensiva se refiere a la mutación del ADN de una región de un gen que codifica una proteína que cambia el secuencia de aminoácidos de codón de la proteína y a continuación por medio de la determinación a través de secuenciación u otras tecnologías que se han llevado a cabo todas las mutaciones y en el caso óptimo dispuestas en una matriz donde cada clon está en una posición identificable y/o etiquetada de manera única. Luego, se lleva a cabo un examen de todos los mutantes expresados para garantizar que todos se expresen de manera comprensiva para un fenotipo mejorado con el fin de proporcionar una cobertura comprensiva garantizada, es decir, una biblioteca de CPE con Cribado Comprensivo que comprende el proceso de CPE BioAtla. Los clones que no expresan en el sistema de selección también se medirán de manera simultánea para la expresión para asegurar que no estén etiquetados incorrectamente como mutaciones negativas o neutras una vez habilitadas para la expresión de un sistema alternativo tal como la transcripción y traducción *in vitro*. De manera alternativa, la secuenciación se podría llevar a cabo en todos los clones después del cribado, pero debe incluir todos los clones negativos, neutros y mejorados. Cualquier mutante no identificado entonces se añade en una segunda ronda de cribado para producir y una verdadera mutagénesis comprensiva y sistema de expresión/actividad de cribado tal como CPE. Esto es posible en parte por los últimos éxitos en la secuenciación de alto rendimiento que no existían previamente.

50 Las “sustituciones conservadoras de aminoácidos” se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de aminoácidos de sustitución conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

El término “corresponde a” se utiliza en la presente memoria para significar que una secuencia de polinucleótidos es

homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada de manera evolutiva) a toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptidos es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia. En contraposición, el término “complementario a” se utiliza en la presente memoria para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos “TATAC” corresponde a un “TATAC” de referencia y es complementaria a una secuencia de referencia “GTATA”.

El término cantidad “eficaz degradante” se refiere a la cantidad que se requiere para procesar por lo menos 50% del sustrato, en comparación con sustrato no en contacto con la enzima. Con preferencia, se degrada por lo menos 80% del sustrato.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “marco de secuencia definido” se refiere a un conjunto de secuencias definidas que se seleccionan de forma no aleatoria, por lo general sobre la base de los datos experimentales o datos estructurales; por ejemplo, un marco de secuencia definida puede comprender un conjunto de secuencias de aminoácidos que se predice para formar una estructura de hoja  $\beta$  o puede comprender un motivo de repetición heptad de cierre de leucina, un dominio de dedo de zinc, entre otras variaciones. Un “núcleo de secuencia definida” es un conjunto de secuencias que abarcan un ámbito limitado de variabilidad. Mientras que (1) una secuencia de 10-mer completamente aleatoria de los 20 aminoácidos convencionales puede ser cualquiera de (20) 10 secuencias, y (2) una secuencia pseudoaleatoria de 10-mer de los 20 aminoácidos convencionales puede ser cualquiera de (20) 10 secuencias pero exhibirán un sesgo para ciertos residuos en ciertas posiciones y/o por lo general, (3) un núcleo de secuencia definida es un subconjunto de secuencias si cada posición de residuo se le permitió ser cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales permisibles (y/o amino/imino ácidos no convencionales admisibles). Un núcleo de secuencia definida comprende por lo general posiciones de residuos variantes e invariantes y/o comprende las posiciones de residuos variantes que pueden comprender un residuo seleccionado de un subconjunto definido de residuos de aminoácidos, y similares, ya sea en segmentos o sobre toda la longitud de la secuencia de miembros de la biblioteca individual seleccionada. Los núcleos de secuencia definida se pueden referir a cualquiera de las secuencias de aminoácidos o secuencias de polinucleótidos. A modo de ilustración y no de limitación, las secuencias de (NNK) 10 y (NNM) 10, en las que N representa A, T, G, o C; K representa G o T; y M representa A o C, son núcleos de secuencia definida.

El término “desinmunización” de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria se refiere a la producción de una variante de la molécula de unión de plantilla, que se modifica en comparación con una molécula de tipo salvaje original por medio de la prestación de dicha variante no inmunogénica o menos inmunogénica en seres humanos. Las moléculas desinmunizadas de acuerdo con la invención se refieren a anticuerpos o partes de los mismos (como marcos y/o CDR) de origen no humano. Los ejemplos correspondientes son anticuerpos o fragmentos de los mismos de acuerdo con lo descrito en la Patente US 4.361.549. El término “desinmunizado” también se refiere a moléculas, que muestran una reducción de la propensión a generar epítomos de células T. De acuerdo con esta invención, el término “reduce la propensión a generar epítomos de células T” se refiere a la eliminación de epítomos de células T que conducen a la activación de células T específica.

Además, la reducción de la propensión a generar epítomos de células T significa la sustitución de aminoácidos que contribuyen a la formación de epítomos de células T, es decir, la sustitución de aminoácidos, que son esenciales para la formación de un epítomo de células T. En otras palabras, la reducción de la propensión a generar epítomos de células T se refiere a la inmunogenicidad reducida o reducción de la capacidad para inducir la proliferación de células T independiente de antígeno. Además, la reducción de la propensión a generar epítomos de células T se refiere a la desinmunización, lo que significa pérdida o reducción de potenciales epítomos de células T de secuencias de aminoácidos que inducen la proliferación de células T independiente de antígeno.

El término “epítomo de células T” de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria se refiere a secuencias cortas de péptidos que se pueden liberar durante la degradación de péptidos, polipéptidos o proteínas dentro de las células y, posteriormente, se presentan por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés) con el fin de desencadenar la activación de las células T; véase, *inter alia*, la Patente WO 02/066514. Para péptidos presentados por MHC de clase II tal activación de las células T a continuación, puede inducir una respuesta de anticuerpos por la estimulación directa de las células B para producir dichos anticuerpos.

La “digestión” de ADN se refiere a la escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa sólo en ciertas secuencias en el ADN. Las diversas enzimas de restricción utilizadas en la presente memoria están disponibles comercialmente y se utilizaron sus condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos como sería conocido para aquellos con experiencia en la técnica. Para fines analíticos, de manera típica 1  $\mu$ g de plásmido o fragmento de ADN se utiliza con aproximadamente 2 unidades de enzima en aproximadamente 20  $\mu$ l de solución tampón. Para el propósito de aislar fragmentos de ADN para la construcción de plásmidos, de manera típica de 5 a 50  $\mu$ g de ADN se digieren con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. Los tampones apropiados y las cantidades de sustrato para enzimas de restricción particulares están especificados por el fabricante. Los tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a 37 °C se utilizan de manera ordinaria, pero puede variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la digestión, la reacción se somete a electroforesis directamente sobre

un gel para aislar el fragmento deseado.

El término "barajado de ADN" se utiliza en la presente memoria para indicar la recombinación entre secuencias sustancialmente homólogas pero no idénticas, en algunas formas de realización, el barajado de ADN puede implicar el cruce a través de recombinación no homóloga, tal como a través de sistemas cer/lox y/o flp/frt y similares. El barajado puede ser aleatorio o no aleatorio.

De acuerdo con lo utilizado en esta invención, el término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico en un antígeno, tal como un polipéptido de fitasa, al cual se une el paratopo de un anticuerpo, tal como un anticuerpo específico de fitasa. Los determinantes antigénicos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específicas. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria "epítopo" se refiere a aquella porción de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interactúa con el cuerpo de unión de una región variable de anticuerpo. De manera típica, tal interacción de unión se manifiesta como un contacto intermolecular con uno o más residuos de aminoácidos de una CDR.

El término "evolución" se refiere a un cambio en por lo menos una propiedad, característica o actividad de una proteína o anticuerpo modificado de manera genética o sintética en comparación con una proteína de plantilla o de anticuerpos.

Los términos "fragmento", "derivado" y "análogo" cuando se refiere a un polipéptido de referencia comprenden un polipéptido que retiene por lo menos una función o actividad biológica que es por lo menos esencialmente igual que la del polipéptido de referencia. Además, los términos "fragmento", "derivado" o "análogo" se ejemplifican por una molécula de "pro-forma", tal como una proproteína de baja actividad que se puede modificar por medio de escisión para producir una enzima madura con actividad significativamente mayor.

En la presente memoria se proporciona un método para la producción de un polipéptido plantilla de un conjunto de polipéptidos de progenie en la que una "gama completa de sustituciones de aminoácido" se representa en cada posición de aminoácido. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, una "gama completa de sustituciones de aminoácido" es en referencia a los 20 alfa-aminoácidos formadores de polipéptidos codificados de forma natural, de acuerdo con lo descrito en la presente memoria.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena de polipéptidos; incluye regiones que preceden y siguen a la región de codificación (líder y remolque) así como también secuencias intermedias (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

La "inestabilidad genética", de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, se refiere a la tendencia natural de secuencias altamente repetitivas que se pierde a través de un proceso de eventos reductores por lo general implican simplificación secuencia a través de la pérdida de secuencias repetidas. Las supresiones tienden a implicar la pérdida de una copia de una repetición y todo entre las repeticiones.

El término "heterólogo" significa que una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla es incapaz de hibridarse con otra secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla o su complemento. Por lo tanto, las áreas de heterología significan que las áreas de los polinucleótidos o polinucleótidos tienen áreas o regiones dentro de su secuencia que son incapaces de hibridar con otro ácido nucleico o polinucleótido. Tales regiones o áreas son, por ejemplo, áreas de mutaciones.

El término "homólogo" o "homeólogo" significa que una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla de ácido nucleico se puede hibridar con una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla complementario. El grado de hibridación puede depender de un número de factores, que incluyen la cantidad de identidad entre las secuencias y las condiciones de hibridación, tales como la temperatura y las concentraciones de sal de acuerdo con lo discutido más adelante. Con preferencia, la región de identidad es superior a aproximadamente 5 bp, con mayor preferencia la región de identidad es superior a 10 bp.

El término "humanizado" se utiliza para describir anticuerpos en los que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un animal mamífero, por ej., un ratón, se combinan con una región marco humana. A menudo, los polinucleótidos que codifican las CDR aisladas se inserta en polinucleótidos que codifican un marco de región variable adecuado (y regiones de manera opcional constantes) para formar polinucleótidos que codifican anticuerpos completos (por ej., humanizados o totalmente humanos), fragmentos de anticuerpos, y similares. En otro aspecto, además de los anticuerpos de ratón, se pueden humanizar otras especies, tal como, por ejemplo, otro roedor, camello, conejo, gato, perro, carne de cerdo, caballo, vaca, pescado, llama y tiburón. En un aspecto amplio, cualquier especie que produce anticuerpos se puede utilizar en la producción de anticuerpos humanizados. De manera adicional, los anticuerpos de la invención pueden ser quiméricos, similares a humanos, humanizados o



totalmente humanos, con el fin de reducir su potencial antigenicidad, sin reducir su afinidad por su destino. Los anticuerpos quiméricos, similares a humanos y humanizados por lo general se han descrito en la técnica. Por medio de la incorporación de una secuencia tan poco extraña como sea posible en el anticuerpo híbrido, se reduce la antigenicidad. La preparación de estos anticuerpos híbridos se puede llevar a cabo por métodos muy conocidos en la técnica.

Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina está compuesta por una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas CDR. La extensión de la región marco y las CDR se han definido con precisión (véase, "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", Kabat *et al.*, 1987). Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, una "región marco humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (alrededor de 85 o más, por lo general 90 a 95 o más) a la región marco de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región marco de un anticuerpo, que es las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son las principales responsables de la unión a un epítipo de un antígeno.

De acuerdo con esta invención, una región marco se refiere a una región en el dominio V (dominio VH o VL) de las inmunoglobulinas que proporciona un almacén de proteína para las regiones determinantes de complementariedad hipervariables (CDR) que hacen contacto con el antígeno. En cada dominio V, hay cuatro regiones marco designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. El marco 1 abarca la región desde el N-terminal del dominio V hasta el comienzo de la CDR 1, el marco 2 se refiere a la región entre la CDR 1 y la CDR 2, el marco 3 abarca la región entre la CDR 2 y la CDR 3 y el marco 4 significa la región desde el final de la CDR 3 hasta el C-terminal del dominio V; véase, *inter alia*, Janeway, *Immunobiology*, Garland Publishing, 2001, 5ta ed. Por lo tanto, las regiones marco abarcan todas las regiones fuera de las regiones CDR de los dominios VH o VL.

Aquéllos con experiencia en la técnica están en condiciones con facilidad de deducir de una secuencia dada las regiones marco y, las CDR; véase Kabat (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta edición., NIH Publication Núm. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, Chothia (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901 a 917 y Chothia (1989) *Nature*, 342, 877 a 883.

Los beneficios de esta invención se extienden a "aplicaciones industriales" (o procesos industriales), dicho término se utiliza para incluir aplicaciones en la industria comercial adecuada (o simplemente industria), así como también aplicaciones industriales no comerciales (por ej., investigación biomédica en una institución no lucrativa). Las aplicaciones de interés incluyen aquellas en las áreas de diagnóstico, la medicina, la agricultura, la industria y el mundo académico.

El término "idéntico" o "identidad" significa que dos secuencias de ácido nucleico tienen la misma secuencia o una secuencia complementaria. Por lo tanto, "áreas de identidad" significa que las regiones o áreas de un polinucleótido o el polinucleótido en general son idénticas o complementarias a las áreas de otro polinucleótido o el polinucleótido.

El término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ej., el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o proteína presente en un animal vivo de origen natural no está aislado, pero el mismo polinucleótido o proteína, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, se aísla. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o proteínas podrían ser parte de una composición, y aún ser aislados en que tal vector o composición no son parte de su entorno natural.

Por "ácido nucleico aislado" se entiende un ácido nucleico, por ej., una molécula de ADN o ARN, que no es inmediatamente contiguo a los extremos 5' y 3' que flanquean las secuencias con las que normalmente es inmediatamente contiguo cuando está presente en el genoma de origen natural del organismo del que se deriva. Así pues, el término describe, por ejemplo, un ácido nucleico que se incorpora en un vector, tal como un plásmido o vector viral; un ácido nucleico que se incorpora en el genoma de una célula heteróloga (o el genoma de una célula homóloga, pero en un sitio diferente de aquel en el que se produce de forma natural); y un ácido nucleico que existe como una molécula separada, por ej., un fragmento de ADN producido por medio de amplificación por PCR o digestión con enzimas de restricción, o una molécula de ARN producida por medio de transcripción *in vitro*. El término también describe un ácido nucleico recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales que se pueden utilizar, por ejemplo, en la producción de una proteína de fusión.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria "ligando" se refiere a una molécula, tal como un péptido aleatorio o secuencia de segmento de variables, que es reconocida por un receptor particular. Como aquéllos con experiencia en la técnica reconocerán, una molécula (o complejo macromolecular) pueden ser tanto un receptor como un ligando. En general, la pareja de unión que tiene un peso molecular más pequeño se conoce como el ligando y la pareja de unión que tiene un peso molecular mayor se conoce como un receptor.

La "ligación" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de cadena

doble (Maniatis *et al.*, 1982, pág. 146). A menos que se disponga otra cosa, la ligación se puede conseguir por el uso de tampones y condiciones conocidos con 10 unidades de ADN ligasa T4 ("ligasa") por 0,5 µg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a ligar.

5 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, "enlazador" o "espaciador" se refiere a una molécula o grupo de moléculas que conecta dos moléculas, tales como una proteína de unión a ADN y un péptido aleatorio, y sirve para colocar las dos moléculas en una configuración preferida, por ej., por lo que el péptido aleatorio se puede unir a un receptor con impedimento estérico mínimo de la proteína de unión a ADN.

10 El término "presentación en superficie celular de mamífero" se refiere a una técnica por medio de la cual una proteína o un anticuerpo, o una porción de un anticuerpo, se expresa y se muestran en una superficie de célula huésped de mamífero con fines de detección; por ejemplo, por medio del cribado de antígeno específico de unión por medio de una combinación de perlas magnéticas y de células activadas por fluorescencia. En un aspecto, los vectores de expresión de mamíferos se utilizan para la expresión simultánea de inmunoglobulinas tanto como una forma secretada y unida a la superficie celular como en DuBridge *et al.*, US 2009/0136950, que se incorpora como referencia en la presente memoria. En otro aspecto, las técnicas de Gao *et al.* se emplean para una codificación de vector viral para una biblioteca de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se muestran en las membranas celulares cuando se expresa en una célula como en Gao *et al.*, US 2007/0111260, que se incorpora como referencia en la presente memoria. La presentación de superficie de IgG entera en células de mamífero es conocida. Por ejemplo, Akamatsu *et al.* desarrolló un vector de presentación de superficie de células de mamíferos, adecuado para aislar directamente las moléculas de IgG en función de su afinidad de unión al antígeno y su actividad biológica. El uso de un vector episomal derivado de virus de Epstein-Barr, las bibliotecas de anticuerpos se presentan como moléculas de IgG enteras en la superficie celular y se criban para el antígeno de unión específico por una combinación de perlas magnéticas y la clasificación de células activadas por fluorescencia. Los plásmidos que codifican anticuerpos con características de unión deseadas se recuperaron de células clasificadas y se convirtieron a la forma para la producción de IgG soluble. Akamatsu *et al. J. Immunol. Methods* 2007 327 (1-2): 40 a 52; que se incorpora como referencia en la presente memoria. Ho *et al.* utilizó células de riñón embrionarias humanas 293T que se utilizan ampliamente para la expresión de proteína transitoria para la presentación de la superficie celular de anticuerpos Fv de cadena sencilla para la maduración de afinidad. Las células que expresan un anticuerpo mutante raro con mayor afinidad se enriquecieron 240 veces por una célula de una sola pasada de clasificación de un gran exceso de células que expresan anticuerpo WT con una afinidad ligeramente inferior. Además, un mutante altamente enriquecido se obtuvo con una mayor afinidad de unión para CD22 después de una sola selección de una biblioteca combinatoria que aleatoriza un punto de acceso de anticuerpo intrínseco. Ho *et al. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 20 de junio de 2006; 103 (25): 9637 a 9642; que se incorpora como referencia en la presente memoria.

35 Beerli *et al.* utilizó células B específicas para un antígeno de interés que fueron directamente aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés) de donantes humanos. Las bibliotecas de Fv de cadena sencilla (scFv, por su sigla en inglés) específicas de antígeno recombinantes se generan a partir de este grupo de células B y se criba por medio de presentación de superficie de células de mamífero por el uso de un sistema de expresión del virus Sindbis. Este método permite el aislamiento de anticuerpos específicos de antígeno por una única ronda de FACS. Las regiones variables (VR) de las cadenas pesada (HC) y las cadenas ligeras (LC) se aislaron a partir de clones positivos y anticuerpos totalmente humanos recombinantes producidos como IgG o fragmentos Fab enteros. De esta manera, se aislaron varios anticuerpos de alta afinidad de unión hipermutados de partículas similares a virus Qβ (VLP), un antígeno viral modelo, así como también anticuerpos específicos para la nicotina. Todos los anticuerpos mostraron altos niveles de expresión en cultivo de células. Los mAbs específicos de nicotina humanos fueron validados preclínicamente en un modelo de ratón. Beerli *et al.*, el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos por medio de la presentación de células de mamíferos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* A. 23 de septiembre de 2008; 105 (38): 14336 a 14341; que se incorpora como referencia en la presente memoria.

50 La presentación en la superficie celular de la levadura también se conoce, por ejemplo, véase Kondo y Ueda 2004, *Yeast cell-surface display applications of molecular display, Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64(1): 28 a 40, que describe, por ejemplo, un sistema de manipulación de la superficie celular por el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Varios sistemas de presentación representativos para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* se describen en Lee *et al.*, 2003, *Microbial cell-surface display, TRENDS in Biotechnol.* 21(1): 45 a 52. También Boder y Wittrup 1997, *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nature Biotechnol.*, 15(6): 553.

55 El término "fabricación" se refiere a la producción de una proteína en una cantidad suficiente para permitir por lo menos las pruebas clínicas de Fase I de una proteína terapéutica, o la cantidad suficiente para la aprobación regulatoria de una proteína de diagnóstico.

El término "mutación sin sentido" se refiere a una mutación de punto en donde se cambia un solo nucleótido, lo que da como resultado un codón que codifica para un aminoácido diferente. Las mutaciones que cambian un aminoácido a un codón de terminación se denominan mutaciones sin sentido.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, una “propiedad molecular a ser evolucionada” incluye la referencia a moléculas que consisten en una secuencia de polinucleótidos, moléculas que comprenden una secuencia de polipéptidos, y las moléculas comprendidas en parte por una secuencia de polinucleótidos y en parte por una secuencia de polipéptido. Los ejemplos en particular relevantes (pero de ninguna manera limitantes) de propiedades moleculares a ser evolucionadas incluyen las actividades enzimáticas en condiciones especificadas, tales como las relacionadas con la temperatura; la salinidad; la presión; el pH; y la concentración de glicerol, el DMSO, el detergente, y/o cualquier otra especie molecular con la que el contacto se hace en un entorno de reacción. Los ejemplos en particular relevantes adicionales (pero en ningún sentido limitativos de propiedades moleculares a ser evolucionadas incluyen estabildades) por ej., la cantidad de una propiedad molecular residual que está presente después de un tiempo de exposición específico a un entorno específico, tal como se puede encontrar durante el almacenamiento.

El término “Mapeo de Epítomos Multidimensional” (MEM, por su sigla en inglés) se refiere a la identificación del epítopo y la resolución de los aminoácidos que son importantes para la unión de anticuerpos. La información sobre los sitios de unión (epitopos) de proteínas reconocidas por los anticuerpos es importante para su uso como herramientas biológicas o de diagnóstico, así como también para la comprensión de sus mecanismos de acción. Sin embargo, los antígenos son muy diversos, en su secuencia primaria, así como también en estructuras tridimensionales. Los epítomos por lo general se clasifican en 3 categorías: 1) epítomos lineales, es decir, el anticuerpo se une a los residuos en la parte lineal de la cadena de polipéptido, 2) epítomos conformacionales, donde el sitio de unión está formado por un elemento estructural (por ej.,  $\alpha$ -hélice, bucle), 3) epítomos discontinuos, donde dos o más tramos separados de la cadena de polipéptido que se ponen juntos en la estructura tridimensional del antígeno forman la superficie de unión.

El término “mutación” se refiere a la creación de una mutación en una secuencia de ácido nucleico; en el caso donde la mutación se produce dentro de la región de codificación de una proteína, que dará lugar a un cambio de codón que puede o no dar lugar a un cambio de aminoácido.

El término “mutaciones” significa cambios en la secuencia de una secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje o cambios en la secuencia de un péptido o polipéptidos. Tales mutaciones pueden ser mutaciones puntuales, tales como transiciones o transversiones. Las mutaciones pueden ser supresiones, inserciones o duplicaciones.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, la secuencia de nucleótidos degenerada “N,N,G/T” representa 32 tripletes posibles, donde “N” puede ser A, C, G o T.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, la secuencia de nucleótidos degenerada “N,N,N” representa 64 tripletes posibles, donde “N” puede ser A, C, G o T.

El término “de origen natural” de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria de acuerdo con lo aplicado al objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótidos que está presente en un organismo (que incluyen virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado de manera intencionada por el hombre en el laboratorio es de origen natural. Por lo general, el término que ocurre de forma natural se refiere a un objeto como presente en un individuo no patológico (no enfermos), tal como sería típico de la especie.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, una “molécula de ácido nucleico” está compuesta por al menos una base o un par de bases, dependiendo de si es de cadena sencilla o de cadena doble, respectivamente. Además, una molécula de ácido nucleico puede pertenecer de manera exclusiva o quimérica a cualquier grupo de moléculas que contienen nucleótidos, de acuerdo con lo ejemplificado por, pero no limitado a, los siguientes grupos de moléculas de ácido nucleico: ARN, ADN, ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos no genómicos, de origen natural y de origen no natural, ácidos nucleicos y ácidos nucleicos sintéticos. Esto incluye, a modo de ejemplo no limitativo, los ácidos nucleicos asociados con cualquier orgánulo, tales como la mitocondria, el ARN ribosomal, y las moléculas de ácido nucleico comprendidas quiméricamente de uno o más componentes que no son de origen natural, junto con componentes de origen natural.

De manera adicional, una “molécula de ácido nucleico” puede contener, en parte, uno o más componentes no basados en nucleótidos de acuerdo con lo ejemplificado por, pero no limitado a, aminoácidos y azúcares. Por lo tanto, a modo de ejemplo, pero sin limitación, una ribozima que es en parte basada en nucleótidos y en parte basada en proteínas se considera una “molécula de ácido nucleico”.

Además, a modo de ejemplo, pero sin limitación, una molécula de ácido nucleico que está marcado con un resto detectable, tal como un marcador radiactivo o, de manera alternativa, una etiqueta no radiactiva, que se considera igualmente una “molécula de ácido nucleico”.

Los términos “secuencia de ácido nucleico que codifica” o una “secuencia de codificación de ADN de” o una

“secuencia de nucleótidos que codifica” una proteína particular (así como también otros términos sinónimos) se refieren a una secuencia de ADN que se transcribe y traduce en una proteína cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Una “secuencia de promotor” es una región reguladora de ADN capaz de unir la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación corriente abajo (dirección 3'). El promotor es parte de la secuencia de ADN. Esta región de la secuencia tiene un codón de inicio en su terminal 3'. La secuencia de promotor sí incluye el número mínimo de bases donde los elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Sin embargo, después de que la ARN polimerasa une la secuencia y la transcripción se inicia en el codón de inicio (terminal 3' con un promotor), la transcripción procede corriente abajo en la dirección 3'. Dentro de la secuencia de promotor se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido de manera conveniente por medio del mapeo con nucleasa S1), así como también dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

Los términos “ácido nucleico que codifica una proteína” o “ADN que codifica una proteína” o “polinucleótido que codifica una proteína” y otros términos sinónimos abarcan un polinucleótido que incluye sólo la secuencia que codifica la proteína, así como también un polinucleótido que incluye la secuencia de codificación adicional y/o de codificación no CQ3.

En una forma de realización preferida, una “especie de molécula de ácido nucleico específica” está definida por su estructura química, de acuerdo con lo ejemplificado por, pero no limitado a, su secuencia primaria. En otra forma de realización preferida, una “especie de molécula de ácido nucleico” específica se define por una función de la especie de ácido nucleico o por una función de un producto derivado de la especie de ácido nucleico. De este modo, a modo de ejemplo no limitativo, una “especie de molécula de ácido nucleico específica” se pueden definir por una o más actividades o propiedades atribuibles a la misma, incluidas las actividades o propiedades atribuibles su producto expresado.

La presente definición de “montaje de una muestra de ácido nucleico de trabajo en una biblioteca de ácido nucleico” incluye el proceso de incorporación de una muestra de ácido nucleico en una colección basada en vectores, tales como por medio de la ligación en un vector y la transformación de un huésped. Una descripción de vectores pertinentes, huéspedes, y otros reactivos, así como también ejemplos no limitantes específicos de los mismos se proporcionan a continuación. La presente definición de “montaje de una muestra de ácido nucleico de trabajo en una biblioteca de ácido nucleico” también incluye el proceso de incorporación de una muestra de ácido nucleico en una colección no basada en vectores, tal como por medio de ligación de adaptadores. Con preferencia, los adaptadores se pueden hibridar con los cebadores de PCR para facilitar la amplificación por medio de PCR.

De acuerdo con ello, en una forma de realización no limitante, una “biblioteca de ácido nucleico” está compuesta por una colección basada en vectores de una o más moléculas de ácido nucleico. En otra forma de realización preferida una “biblioteca de ácido nucleico” está compuesta por una colección no basada en vectores de moléculas de ácido nucleico. En aún otra forma de realización preferida, una “biblioteca de ácido nucleico” está compuesta por una colección combinada de moléculas de ácido nucleico que es en parte basada en vector y en parte no basada en vectores. Con preferencia, la colección de moléculas que comprenden una biblioteca se puede buscar y separar de acuerdo con la especie de molécula de ácido nucleico individual.

La presente invención proporciona un “constructo de ácido nucleico” o de manera alternativa un “constructo de nucleótidos” o, de manera alternativa, un “constructo de ADN”. El término “constructo” se utiliza en la presente memoria para describir una molécula, tal como un polinucleótido (por ej., un polinucleótido de fitasa) de manera opcional puede estar enlazado de manera química a uno o más restos adicionales moleculares, tales como un vector, o partes de un vector. En un aspecto específico (pero de ninguna manera limitante), un constructo de nucleótidos se ejemplifica por constructos de expresión de ADN adecuados para la transformación de una célula huésped.

Un “oligonucleótido” (o como sinónimo un “oligo”) se refiere a un polidesoxinucleótido de cadena sencilla o dos cadenas complementarias de polidesoxinucleótido que se pueden sintetizar químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos pueden o no tener un fosfato 5'. Aquellos que no lo hacen no se ligarán a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en la presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se ligará a un fragmento que no ha sido desfosforilado. Para lograr la amplificación basada en polimerasa (tal como con PCR), se menciona un “oligonucleótido degenerado 32 veces que está compuesto por, en serie, por lo menos una primera secuencia homóloga, una secuencia degenerada N,N,G/T, y una segunda secuencia homóloga”. De acuerdo con lo utilizado en este contexto, “homólogo” hace referencia a la homología entre el oligo y el polinucleótido parental que se somete a la amplificación basada en polimerasa.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “unido de manera operativa” se refiere a un enlace de elementos de polinucleótidos en una relación funcional. Un ácido nucleico está “unido de manera operativa” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido de manera operativa a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia de codificación. Unido de manera operativa significa que las secuencias de ADN que se unen de manera típica son

contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones de codificación de proteína, contiguas y en marco de lectura.

Una secuencia de codificación está “unida de manera operativa a” otra secuencia de codificación cuando la ARN polimerasa transcribirá las dos secuencias de codificación en un único ARNm, que luego se traduce en un único polipéptido que tiene aminoácidos derivados de ambas secuencias de codificación. Las secuencias de codificación no necesitan ser contiguas entre sí con la condición de que las secuencias expresadas en última instancia se procesen para producir la proteína deseada.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria el término “condiciones fisiológicas” se refiere a la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la viscosidad, y parámetros bioquímicos similares que son compatibles con un organismo viable, y/o que existen de manera típica intracelularmente en una célula de levadura o célula de mamífero cultivada viable. Por ejemplo, las condiciones intracelulares en una célula de levadura cultivada en condiciones típicas de cultivo de laboratorio son condiciones fisiológicas. Las condiciones de reacción *in vitro* adecuadas para los cócteles de transcripción *in vitro* por lo general son condiciones fisiológicas. En general, las condiciones fisiológicas *in vitro* comprenden NaCl o KCl de 50 a 200 mM, un pH de 6,5 a 8,5, de 20 a 45 °C y 0,001 a 10 mM de catión divalente (por ej., Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>); con preferencia de aproximadamente NaCl o KCl de 150 mM, pH de 7,2 a 7,6, 5 mM de catión divalente, y, a menudo incluyen de 0,01 a 1,0 por ciento de proteína no específica (por ej., BSA). Un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton X-100) a menudo puede estar presente, por lo general en aproximadamente de 0,001 a 2%, de manera típica 0,05 a 0,2% (v/v). Se pueden seleccionar condiciones acuosas particulares por el profesional a cargo de acuerdo con métodos convencionales. Para una guía general, las siguientes condiciones acuosas tamponadas pueden ser aplicables: NaCl de 10 a 250 mM, Tris HCl de 5 a 50 mM, pH de 5 a 8, con la adición opcional de cationes divalentes y/o quelantes de metales y/o detergentes no iónicos y/o fracciones de membrana y/o agentes antiespumantes y/o centelleantes.

El término “población” de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria significa una colección de componentes tales como polinucleótidos, porciones o polinucleótidos o proteínas. Una “población mixta” significa una colección de componentes que pertenecen a la misma familia de ácidos nucleicos o proteínas (es decir, están relacionados) pero que se diferencian en su secuencia (es decir, no son idénticos) y por lo tanto en su actividad biológica.

Una molécula que tiene una “pro-forma” se refiere a una molécula que experimenta cualquier combinación de una o más modificaciones químicas covalentes y no covalentes (por ej., glicosilación, escisión proteolítica, dimerización u oligomerización, cambio conformacional inducido por la temperatura o inducido por el pH, la asociación con un cofactor, etc.) en ruta para alcanzar una forma molecular más madura que tiene una diferencia de propiedad (por ej., un incremento de la actividad), en comparación con la molécula proforma de referencia. Cuando dos o más modificaciones químicas (por ej., dos escisiones proteolíticas, o una escisión proteolítica y una desglicosilación) se pueden distinguir en ruta para la producción de una molécula madura, la molécula de precursor de referencia se puede denominar una molécula de “pre-pro-forma”.

Una “propiedad” puede describir cualquier característica, que incluyen una propiedad característica física, química o de actividad de una proteína o anticuerpo a ser optimizado. Por ejemplo, en ciertos aspectos, la propiedad, característica o actividad predeterminada a ser optimizada se puede seleccionar de la reducción de la agregación de proteína-proteína, la mejora de la estabilidad de proteínas, el incremento de la solubilidad de proteínas, el incremento de la estabilidad del pH de proteínas, el incremento de la estabilidad de la temperatura de proteínas, el incremento de la estabilidad del solvente de proteínas, el incremento de la selectividad, la disminución de la selectividad, la introducción de sitios de glicosilación, la introducción de sitios de conjugación, la reducción de la inmunogenicidad, la mejora de la expresión de proteínas, el incremento de la afinidad por el antígeno, la disminución de la afinidad por el antígeno, un cambio en la afinidad de unión, un cambio en la inmunogenicidad, un cambio en la actividad catalítica, la optimización del pH, o la mejora de la especificidad. Una propiedad “optimizada” se refiere a un cambio deseable en una propiedad particular en una proteína mutante o anticuerpo en comparación con una proteína o un anticuerpo de plantilla, respectivamente.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “pseudoaleatorio” se refiere a un conjunto de secuencias que tienen variabilidad limitada, de manera tal que, por ejemplo, el grado de variabilidad del residuo en otra posición, pero a cualquier posición pseudoaleatoria se le permite algún grado de variación de residuo, sin embargo circunscritos.

Las “unidades cuasi repetidas”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, se refiere a las repeticiones que ser reordenadas y son, por definición, no idénticas. De hecho, se propone el método no sólo para unidades de codificación prácticamente idénticas producidas por mutagénesis de la secuencia de partida idéntica, sino también la recombinación de secuencias similares o relacionadas que pueden diferir de manera significativa en algunas regiones. Sin embargo, si las secuencias contienen suficientes homologías a ser reafirmadas por este enfoque, se pueden denominar como unidades “cuasi repetidas”.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, una “biblioteca de péptidos aleatorios” se refiere a un conjunto de secuencias de polinucleótidos que codifica un conjunto de péptidos aleatorios, y para el conjunto de péptidos

aleatorios codificados por las secuencias de polinucleótidos, así como también las proteínas de fusión contienen aquellos péptidos aleatorios.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, una “secuencia de péptido aleatorios” se refiere a una secuencia de aminoácidos compuesta por dos o más monómeros de aminoácidos y construido por un proceso estocástico o aleatorio. Un péptido aleatorio puede incluir motivos marco o andamios, que pueden comprender secuencias invariables.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, un “receptor” se refiere a una molécula que tiene una afinidad para un ligando dado. Los receptores pueden ser de origen natural o moléculas sintéticas. Los receptores se pueden emplear en un estado inalterado o como agregados con otras especies. Los receptores pueden estar unidos, de manera covalente o no covalente, a un miembro de unión, directamente o por medio de una sustancia de unión específica. Los ejemplos de receptores incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos, que incluyen anticuerpos monoclonales y antisueros reactivos con determinantes antigénicos específicos (tales como en virus, células u otros materiales), receptores de membrana celular, carbohidratos complejos y glicoproteínas, enzimas, y receptores de hormonas.

Las proteínas “recombinantes” se refieren a enzimas producidas por medio de técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas a partir de células transformadas por un constructo de ADN exógeno que codifica la proteína deseada. Las proteínas “sintética” son las preparadas por medio de síntesis química.

El término “polinucleótidos relacionados” significa que las regiones o áreas de los polinucleótidos son idénticas y las regiones o áreas de los polinucleótidos son heterólogas.

El término “redistribución reductiva”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, se refiere al incremento de la diversidad molecular que se acumula a través de la eliminación (y/o la inserción) de eventos que están mediados por secuencias repetidas.

Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” e “identidad sustancial”.

Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de un ADNc o secuencia génica de longitud completa dada en un listado de secuencias, o puede comprender una secuencia de ADNc o génica completa. Por lo general, una secuencia de referencia es de por lo menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente por lo menos 25 nucleótidos de longitud, y a menudo por lo menos 50 nucleótidos de longitud. Dado que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos de manera típica se llevan a cabo por medio de la comparación de secuencias de los dos polinucleótidos sobre una “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

El término “Índice Repetitivo (RI, por su sigla en inglés)”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, es el número promedio de copias de las unidades cuasi repetidas contenidas en el vector de clonación.

El término “saturación” se refiere a una técnica de evolución, en la que cada cambio posible se hace en cada posición de un polinucleótido plantilla o polipéptido plantilla; sin embargo, el cambio en cada posición no se confirma por medio de pruebas, sino que simplemente se supone de manera estadística en el que la mayoría de los posibles cambios o casi cada cambio posible se estima que ocurre en cada posición de una plantilla. La mutagénesis de saturación se refiere a la mutación del ADN de una región de un gen que codifica una proteína que cambia la secuencia de codones de aminoácidos de la proteína y después por medio del cribado de los mutantes expresados de esencialmente todos los mutantes para un fenotipo mejorado con base en el sobremuestreo estadístico que se aproxima a la amplia cobertura, pero no garantiza la cobertura completa.

El término “identidad de secuencia” significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, sobre una base de nucleótido por nucleótido) sobre la ventana de comparación. El término “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula por medio de la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima sobre la ventana de comparación, la determinación del número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ej., A, T, C, G, U, o I) ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, la división del número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y la multiplicación del resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Esta “identidad sustancial”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, denota una característica de una

5 secuencia de polinucleótidos, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene por lo menos 80 por ciento de identidad de secuencia, con preferencia por lo menos 85 por ciento de identidad de, a menudo una identidad de secuencia del 90 al 95 por ciento, y más comúnmente por lo menos 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia de una ventana de comparación de por lo menos 25 a 50 nucleótidos, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula por medio de la comparación de la secuencia de referencia con la secuencia de polinucleótidos que puede incluir supresiones o adiciones que totalizan 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación.

10 El término "mutación silenciosa" se refiere a un cambio de codón que no da como resultado un cambio de aminoácido en un polipéptido expresado y se basa en la redundancia de uso de codones para la inserción de aminoácidos.

15 De acuerdo con lo conocido en la técnica la "similitud" entre dos proteínas se determina por medio de la comparación de la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de una proteína a la secuencia de una segunda proteína. La similitud se puede determinar por medio de procedimientos que son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, un programa BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica en el Centro Nacional de Información Biológica).

20 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "anticuerpo de cadena sencilla" se refiere a un polipéptido que comprende un dominio VH y un dominio VL en enlace de polipéptido, por lo general ligado a través de un péptido espaciador (por ej., [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]<sub>x</sub>), y que puede comprender secuencias de aminoácidos adicionales en el terminal amino y/o carboxi. Por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla puede comprender un segmento de amarra para ligarse con el polinucleótido de codificación. Como ejemplo, un scFv es un anticuerpo de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla por lo general son proteínas que consisten en uno o más segmentos de polipéptido de por lo menos 10 aminoácidos contiguos sustancialmente codificados por genes de la superfamilia de inmunoglobulinas (por ej., véase Williams y Barclay, 1989, págs. 361 a 368, que se incorpora como referencia en la presente memoria), con más frecuencia codificado por una secuencia de gen de cadena ligera o de 25 cadena pesada de roedor, primate no humano, aviar, bovino porcino, ovino, cabra o humano. Un anticuerpo de cadena sencilla funcional por lo general contiene una porción suficiente de un producto génico de la superfamilia de las inmunoglobulinas con el fin de retener la propiedad de unirse a una molécula de destino específica, de manera típica un receptor o antígeno (epítipo).

30 Los miembros de un par de moléculas (por ej., un par de anticuerpo-antígeno o un par de ácido nucleico) se dice que "se unen de manera específica" entre sí si se unen entre sí con mayor afinidad que a otras moléculas, no específicas. Por ejemplo, un anticuerpo generado contra un antígeno al que se une de manera más eficaz que a una proteína no específica se puede describir como que se une de manera específica al antígeno. (De manera similar, una sonda de ácido nucleico se puede describir como que se une de manera específica a un ácido nucleico de destino si forma un dúplex específico con el objetivo por medio de interacciones de apareamiento de bases (véase 35 más arriba)).

La "hibridación específica" se define en la presente memoria como la formación de híbridos entre un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido (por ej., un polinucleótido que tiene una secuencia distinta pero sustancialmente idéntica al primer polinucleótido), en el que las secuencias de polinucleótidos sustancialmente no relacionadas no forman híbridos en la mezcla.

40 El término "polinucleótido específico" significa un polinucleótido que tiene ciertos puntos finales y que tiene una secuencia de ácido nucleico determinado. Dos polinucleótidos en los que un polinucleótido tiene una secuencia idéntica a una porción del segundo polinucleótido pero diferentes extremos comprende dos polinucleótidos específicos diferentes.

45 El término "condiciones de hibridación rigurosas" significa que la hibridación tendrá lugar solamente si hay por lo menos 90% de identidad, con preferencia por lo menos 95% de identidad y con la mayor de las preferencias por lo menos 97% de identidad entre las secuencias. Véase Sambrook *et al.*, 1989, que se incorpora en su totalidad como referencia en la presente memoria.

50 También se incluyen en la invención polipéptidos que tienen secuencias que son "sustancialmente idénticas" a la secuencia de un polipéptido, tal como uno de cualquier SEC. ID Núm. revelada en la presente memoria. Una secuencia de aminoácidos "sustancialmente idéntica" es una secuencia que se diferencia de una secuencia de referencia sólo en sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo, sustituciones de un aminoácido por otro de la misma clase (por ej., la sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina).

55 De manera adicional, una secuencia de aminoácidos "sustancialmente idéntica" es una secuencia que se diferencia

de una secuencia de referencia o por uno o más sustituciones, supresiones o inserciones no conservadoras, en particular, cuando tal sustitución se produce en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y con la condición de que el polipéptido retenga esencialmente sus propiedades de comportamiento. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden suprimir de un polipéptido de fitasa, lo que da como resultado la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar de manera significativa su actividad biológica. Por ejemplo, los aminoácidos de terminal amino or carboxilo que no son necesarios para la actividad biológica de fitasa se pueden eliminar. Tales modificaciones pueden dar como resultado el desarrollo de polipéptidos de fitasa activos más pequeños.

La presente invención proporciona una "proteína sustancialmente pura". El término "proteína sustancialmente pura" se utiliza en la presente memoria para describir una molécula, tal como un polipéptido (por ej., un polipéptido de fitasa o un fragmento del mismo) que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, y otros materiales biológicos con los que está asociada de forma natural. Por ejemplo, una molécula sustancialmente pura, tal como un polipéptido, puede ser por lo menos 60%, en peso seco, la molécula de interés. La pureza de los polipéptidos se puede determinar por el uso de métodos estándar que incluyen, por ej., electroforesis en gel de poliacrilamida (por ej., SDS-PAGE), cromatografía en columna (por ej., cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por su sigla en inglés)) y análisis de secuencia de aminoácidos amino-terminal.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y con preferencia la fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende por lo menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Por lo general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 a 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Con la mayor de las preferencias, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición por medio de métodos de detección convencionales) donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. Las especies de solventes, moléculas pequeñas (< 500 Daltons), y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, un "oligopéptido de plantilla" significa una proteína para la que se desea una biblioteca secundaria de variantes. De acuerdo con lo que apreciarán aquéllos con experiencia en la técnica, cualquier número de plantillas encuentran uso en la presente invención. Se incluyen de manera específica dentro de la definición de "proteínas" u "oligopéptidos" los fragmentos y dominios de proteínas conocidas, que incluyen dominios funcionales, tales como dominios enzimáticos, dominios de unión, etc., y fragmentos más pequeños, tales como giros, bucles, etc. Es decir, también se pueden utilizar porciones de proteínas. Además, las "proteínas" de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria incluyen proteínas, oligopéptidos y péptidos. Además, se pueden utilizar variantes de proteínas, es decir, estructuras análogas a proteínas de origen no natural.

Las proteínas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, proteínas industriales y farmacéuticas, que incluyen ligandos, receptores de superficie celular, antígenos, anticuerpos, citoquinas, hormonas, factores de transcripción, módulos de señalización, proteínas del citoesqueleto y enzimas. Las clases adecuadas de enzimas incluyen, pero no se limitan a, hidrolasas tales como proteasas, carbohidrasas, lipasas; isomerasas tales como racemasas, epimerasas, tautomerías, o mutasas; transferasas, quinasas, oxidoreductasas, y fosfatasas. Las enzimas adecuadas se enumeran en la base de datos de enzimas Swiss-Prot. Las cadenas principales de proteínas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, todas las que se encuentran en la base de datos de proteínas compilada y mantenida por el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, con anterioridad el Brookhaven National Lab).

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "segmento variable" se refiere a una porción de un péptido naciente que comprende una secuencia de núcleo aleatorio, pseudoaleatorio o definido. Un "segmento variable" se refiere a una porción de un péptido naciente que comprende una secuencia de núcleo aleatorio, pseudoaleatorio o definido. Un segmento variable puede comprender tanto posiciones de residuos variantes como invariantes, y el grado de variación del residuo en una posición de residuo variante puede ser limitada: ambas opciones se seleccionan a discreción del profesional a cargo. De manera típica, los segmentos variables son aproximadamente de 5 a 20 residuos de aminoácidos de longitud (por ej., de 8 a 10), si bien los segmentos variables pueden ser más largos y pueden comprender porciones de anticuerpo o proteínas receptoras, tales como un fragmento de anticuerpo, una proteína de unión de ácido nucleico, una proteína receptora, y similares.

El término "de tipo salvaje" o "de tipo silvestre", significa que el polinucleótido no comprende ninguna mutación. Una proteína "de tipo salvaje" significa que la proteína estará activa a un nivel de actividad que se encuentra en la naturaleza y comprenderá la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la actualidad, la informática se utiliza en la actualidad para guiar la evolución de moléculas de polipéptidos y



5 proteínas por medio de la decisión de dónde hacer mutaciones en las moléculas en una búsqueda por la optimización molecular. La revelación proporciona métodos en los que las mutaciones se llevan a cabo de manera sistemática primero a lo largo de todo el polipéptido o la proteína, a continuación, se crea un mapa para proporcionar la informática útil en el extremo posterior y el mapa se convierte en la guía para dónde enfocar la próxima ronda de mutación. Diversos métodos de evolución comprensiva se utilizan solos y en combinación con el fin de proporcionar datos altamente predictivos para la optimización de proteínas.

La presente invención se refiere a métodos para la identificación y el mapeo de polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un polipéptido plantilla. Estos métodos de evolución se pueden aplicar a todos los tipos terapéuticos de proteínas tales como, por ejemplo, hormonas, enzimas, citoquinas y anticuerpos.

10 Históricamente, el descubrimiento de anticuerpos se ha llevado a cabo en huéspedes eucariotas (euk) y procariotas (prok). De manera típica, en bacterias (*E. coli*), los anticuerpos de longitud parcial se descubren; por ejemplo, en tecnologías de presentación de fagos, los Fab se recuperan y, algunas veces se convierten en longitud completa corriente abajo. Hay varias desventajas potenciales para estos enfoques.

15 En un ejemplo, existe alguna evidencia de que las regiones Fc y Fv se comunican para efectuar las propiedades de anticuerpos, tales como la unión y la expresión. Por lo tanto, cuando un fragmento de anticuerpo se optimiza para una propiedad tal como la expresión, la mejora no siempre se traduce en una expresión mejorada en el anticuerpo ensamblado de longitud completa. Por ejemplo, una biblioteca de Fc se creó en intentos de encontrar un "santo grial" Fc que se le pueda atribuir a cualquier Fv para mejorar la expresión en cualquier huésped.

20 En un aspecto, la mutagénesis del codón se llevó a cabo en la región constante para la optimización de la expresión de célula de mamífero. De manera específica, se crearon 326 mutantes en la región constante y se expresaron en células HEK 293 y células de CHO-S. El cribado se llevó a cabo por medio de ELISA. Varios Fc cumplieron con los criterios de la mejora de la expresión, e incluso se identificaron ciertos Fc optimizados que transfirieron efectos positivos a través de múltiples líneas celulares; sin embargo, cuando un Fv diferente se une a la región Fc, la mejora en la expresión no se tradujo. Esto demuestra que los Fc y Fv se comunican.

25 Con el fin de evitar resultados inesperados tras la recombinación de fragmentos de anticuerpos, en un aspecto preferido, los métodos de la revelación se utilizan para descubrir moléculas de anticuerpo de longitud completa. En otro aspecto preferido, ciertos métodos de la revelación utilizan huéspedes euk.

30 En una forma de realización, el sistema eucariota es un sistema de mamífero y se selecciona de uno del grupo que consiste en líneas celulares de CHO, HEK293, IM9, DS-1, THP-1, Hep G2, COS, NIH 3T3, C33a, A549, A375, SK-MEL-28, DU 145, PC-3, HCT 116, Mia PACA-2, ACHN, Jurkat, MM1, Ovcara 3, HT 1080, Panc-1, U266, 769P, BT-474, Caco-2, HCC 1954, MDA-MB-468, LNCaP, NRK-49F y SP2/0; y esplenocitos de ratón y PBMC de conejo. En un aspecto, el sistema de mamífero se selecciona entre una línea celular CHO o HEK293. En un aspecto específico, el sistema de mamífero es una línea celular CHO-S. En otro aspecto específico, el sistema de mamífero es una línea celular HEK293. En otra forma de realización, el sistema eucariota es un sistema de célula de levadura. En un aspecto, el sistema eucariota se selecciona de células de levadura *S. cerevisiae* o células de levadura *Picchia*.

35 En otra forma de realización, la creación de líneas celulares de mamífero se puede llevar a cabo comercialmente por una organización de investigación por contrato o de fabricación de encargo. Por ejemplo, para anticuerpos recombinantes u otras proteínas, Lonza (Lonza Group Ltd, Basilea, Suiza) puede crear vectores para expresar producto por el uso de la tecnología GS de Gene Expression System™, ya sea con líneas celulares huésped CHOK1SV o NSO.

40 En otra forma de realización, la evolución se puede llevar a cabo en huéspedes prok (tales como *E. coli*) y los cribados pueden ocurrir en huéspedes euk (por ej., CHO).

45 Los métodos para la evolución de moléculas incluyen métodos estocásticos (aleatorios) y los no estocásticos. Los métodos publicados incluyen enfoques de mutagénesis aleatorios y no aleatorios. Cualquiera de estos enfoques se puede emplear para evolucionar propiedades de las proteínas terapéuticas de la presente invención hacia una característica deseada, tales como una mejor estabilidad en diferentes entornos de temperatura o de pH, o una mejor expresión en una célula huésped. Otras propiedades potencialmente deseables, tales como la mejora de la actividad catalítica, la mejora de la estabilidad de proteínas en diversas condiciones, la mejora de la selectividad y/o la solubilidad, y la mejora de los resultados de expresión por medio de la mejora de las características tal como la reducción de la agregación se pueden seleccionar para experimentos de evolución.

50 La evolución se lleva a cabo directamente en un huésped eucariota, tal como una célula huésped de mamífero o una célula huésped de levadura, que se utilizará para la producción corriente abajo de la proteína terapéutica. Los candidatos se pueden desprender para la expresión óptima en el mismo huésped utilizado para cribar y/o evolucionar y para fabricar. La optimización de la expresión se puede conseguir por medio de la optimización de los

5 vectores utilizados (componentes de vector, tales como promotores, sitios de empalme, 5' y 3' y secuencias flanqueantes), la modificación de genes de las células huésped para reducir las supresiones de genes y los reordenamientos, la evolución de las actividades de genes de células huéspedes por medio de métodos *in vivo* o *in vitro* de la evolución de genes relevantes, la optimización de enzimas de glicosilación huéspedes por la evolución de los genes relevantes, y/o por amplias estrategias de mutagénesis de la célula huésped y de selección de cromosomas para seleccionar las células con capacidades de expresión mejoradas. Las células huésped se describen de manera adicional en la presente memoria.

10 La expresión de presentación de la superficie celular y la tecnología de detección (por ej., de acuerdo con lo definido con anterioridad) se pueden emplear para cribar bibliotecas de proteínas evolucionadas para los candidatos a ser fabricados.

15 Los métodos actuales de uso generalizado para la creación de proteínas alternativas de una molécula de partida son tecnologías de mutagénesis dirigidas a oligonucleótidos, reacciones en cadena de la polimerasa propensas a errores y mutagénesis de casete, en el que la región específica a ser optimizada está reemplazada con un oligonucleótido de manera sintética mutagenizado. En estos casos, un número de sitios mutantes se generan alrededor de ciertos sitios en la secuencia original.

20 En la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, una secuencia corta se sustituye con un oligonucleótido mutagenizado de manera sintética. La PCR propensa a errores utiliza condiciones de polimerización de baja fidelidad para introducir un bajo nivel de mutaciones puntuales aleatorias sobre una secuencia larga. En una mezcla de fragmentos de secuencia desconocida, la PCR propensa a errores se puede utilizar para mutagenizar la mezcla. En la mutagénesis de casete, un bloque de secuencia de una única plantilla de manera típica se sustituye por una secuencia (parcialmente) aleatoria.

25 Los genes quiméricos se han llevado a cabo por medio de la unión de 2 fragmentos de polinucleótido por el uso de extremos cohesivos compatibles generados por enzimas de restricción, donde cada fragmento se deriva de una molécula progenitora (o parental) por separado. Otro ejemplo es la mutagénesis de una posición de codón único (es decir, para lograr un cambio, una adición o una supresión de codón) en un polinucleótido parental para generar un único polinucleótido de progeñie que codifica para un único polipéptido mutagenizado en el sitio.

Además, los sistemas de recombinación específica del sitio *in vivo* se han utilizado para generar híbridos de genes, así como también métodos aleatorios de recombinación *in vivo*, y la recombinación entre genes homólogos pero truncados en un plásmido. La mutagénesis también se ha informado por extensión por solapamiento y la PCR.

30 Los métodos no aleatorios se han utilizado para conseguir un mayor número de mutaciones puntuales y/o quimerizaciones, por ejemplo, enfoques comprensivos o exhaustivos se han utilizado para generar todas las especies moleculares dentro de una agrupación particular de mutaciones, para atribuir funciones a grupos estructurales específicas en una molécula de plantilla (por ej., una posición de un solo aminoácido específico o una secuencia compuesta por dos o más posiciones de aminoácidos), y para la categorización y la comparación de agrupaciones específica de mutaciones. La Patente de los Estados Unidos Número 7033781 titulada "*Whole cell engineering my mutagenizing a substantial portion of a starting genome, combining mutations, and optionally repeating*" describe un método para la evolución de un organismo hacia características deseadas. La Patente de los Estados Unidos Número 6764835 titulada "*Saturation mutagenesis in directed evolution*" y la Patente de los Estados Unidos Número 6562594 titulada "*Synthetic ligation reassembly in directed evolution*" describen métodos de evolución y el cribado exhaustivo de las características deseadas de moléculas. Cualquiera de estos métodos se puede utilizar en el método de la presente invención.

45 Hay una diferencia entre los métodos previamente conocidos de "mutagénesis de saturación" y técnicas de evolución "comprensiva" preferida en la presente memoria. La mutagénesis de saturación se refiere a una técnica de la evolución, en el que cada cambio posible se hace en cada posición de un polinucleótido plantilla o polipéptido plantilla; sin embargo, el cambio en cada posición no se confirma por medio de pruebas, sino que simplemente se asume de manera estadística. La evolución comprensiva se refiere a una técnica de evolución, en la que cada cambio posible se hace en cada posición de un polinucleótido plantilla o polipéptido plantilla y el polinucleótido o polipéptido se prueba para confirmar si se ha hecho el cambio previsto.

50 Los métodos de saturación son métodos inherentemente estadísticos, no exhaustivos y también nunca fueron verdaderamente comprensivos a través de todos los pasos (por ejemplo, a través de la generación de mutantes, la identificación de mutantes, la expresión de proteínas mutante, el cribado de la proteína mutante, y la generación de mutantes mejorada y recombinada, la identificación, la expresión y el cribado). En las técnicas de evolución comprensivas, cada molécula se criba y se confirma tanto en el primer paso de mutagénesis, y después en un segundo paso de recombinación de los mutantes o impactos mejorados.

55 A menos que la mutagénesis de saturación se confirme por medio de secuenciación o algún otro método, la técnica

no puede ser considerada como completa por varias razones posibles. Por ejemplo, 1) los sistemas de clonación no son 100% eficientes debido a errores de clonación o síntesis, o difíciles de clonar moléculas o 2) algunas proteínas son tóxicas cuando se expresan y por lo tanto no se puede expresar de manera eficaz. Por lo tanto, es importante confirmar por medio de secuenciación, o alguna otra técnica, en cada paso. Es útil anotar cada paso con el fin de cribar la expresión, por lo que los clones que no expresan no sean designados como “negativos” como en trabajos anteriores, sólo son anotados como no expresables. Por lo tanto, las técnicas comprensivas son consideradas como un sistema no estocástico más puro que las técnicas de saturación, de acuerdo con lo confirmado por el paso de “confirmación”.

### **Evolución Posicional Comprensiva**

Con referencia a la Figura 1, por el uso de un péptido lineal como un simple ejemplo, en un primer paso, un conjunto de variantes de aminoácidos naturales (o un subconjunto de los mismos, o derivados de aminoácidos) para cada codón de la posición 1 a n (n corresponde al número de residuos en la cadena de polipéptidos) se genera por un proceso denominado en la presente memoria como Evolución Posicional Comprensiva (CPE™). Este procedimiento se repite para cada cadena de polipéptidos de la molécula de destino. Un conjunto mínimo de mutaciones de aminoácidos contiene un solo codón para cada uno de los 19 aminoácidos naturales. Sin embargo, se reconoce que cada sistema de expresión puede sufrir de sesgo de codones, en los que la insuficiencia de reuniones de ARNt puede llevar al estancamiento de la traducción, la terminación prematura de la traducción, el cambio de marco de la traducción y la incorporación errónea de aminoácidos. Por lo tanto, para la optimización de la expresión cada conjunto está compuesto por un máximo de 63 codones diferentes, que incluyen los codones de terminación. En el siguiente paso, las mutaciones se confirman por medio de la secuenciación de cada nueva molécula. También se pueden emplear otros métodos de confirmación.

Cada conjunto de aminoácidos a continuación se criba, para por lo menos uno de:

- mejora de la función
- mutaciones neutrales
- mutaciones inhibitoras
- expresión
- compatibilidad del clon con el sistema huésped.

En un aspecto, múltiples características son examinadas para cribar de manera simultánea tal función y expresión tal como, por ejemplo, mejorada.

Los datos de cada conjunto se combinan para toda las cadenas de polipéptido y se genera un mapa funcional detallado (denominado en la presente memoria como un EvoMap™) de la molécula de destino. Este mapa contiene información detallada de cómo cada mutación afecta al rendimiento/expresión y/o la capacidad de clonación de la molécula de destino. Permite la identificación de todos los sitios en los que no se pueden llevar a cabo cambios sin una pérdida en la función de la proteína (o la unión de antígeno/receptor en el caso de anticuerpos). También muestra el lugar donde se pueden llevar a cabo cambios sin afectar la función. El mapa además identifica cambios que dan como resultado las moléculas que no expresan en el sistema huésped, y por lo tanto no evalúan el efecto de la mutación.

Un diagrama esquemático de un EvoMap™ hipotético se muestra en la Figura 1. Cada posición en la plantilla se identifica como un sitio restringido (no mutable), un sitio totalmente mutable, un sitio parcialmente mutable o un mutante mejorado para una sustitución de aminoácidos específica. Cada sitio parcialmente mutable se puede designar además como susceptible a la sustitución con, por ejemplo, un residuo cargado, o una sustitución de residuo no polar, y un clon que no expresa y/o una molécula que no puede ser clonada en el sistema huésped.

Es posible utilizar el EvoMap™ con el fin de reconocer y recombinar las sustituciones de aminoácidos individuales beneficiosos, y cribar para optimizar aún más las características deseadas en la molécula de destino. Sin embargo, la evolución de ciertas características puede requerir dos o más mutaciones simultáneas para volverse observable. El EvoMap™ puede ser explotado para producir de manera eficiente y rentable, un conjunto de polipéptidos mutantes de múltiples sitios de una manera no aleatoria. El conjunto de polipéptidos mutantes de múltiples sitios entonces se puede cribar para los mutantes mejorados de múltiples sitios.

La CPE permite el mapa de mutación de proteína completa *in vivo* confirmado. La identificación de todo el conjunto de mutantes mejorados permite además los pasos de evolución combinatoria. La CPE se puede utilizar con el fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad de las proteínas evolucionadas por la selección de mutaciones no superficiales;

la eliminación de epítomos de células T; y la mímica de mutaciones somáticas.

En un aspecto, se puede utilizar la CPE para generar una biblioteca de los 19 aminoácidos. Los cambios se llevan a cabo en cada posición en la proteína y se criban para una característica deseable, tal como la afinidad de unión o expresión, y se crea el EvoMap™. Se pueden utilizar rondas de mutación y de cribado para generar los datos para los 19 aminoácidos. En el mapa, se identifican los sitios totalmente mutables. Estos sitios son útiles para identificar las posiciones que se pueden modificar para crear una nueva colección de moléculas que se pueden hacer y probar para nuevas características. Por ejemplo, la informática se puede emplear para identificar haplotipos HLA en la secuencia, y se pueden hacer los cambios deseados para evitar estos haplotipos, por medio de cambios específicos de destino en los sitios “neutros” (“completamente mutables”) identificados a partir del mapa, donde la característica primaria no se verá afectada. Esto podría reducir el riesgo de inmunogenicidad (se podría seleccionar mutaciones no superficiales, eliminar epítomos de células T, imitar mutaciones hipersomáticas). Además, el mapa puede mostrar sitios para modificaciones específicas de sitio (glicosilación y conjugación química) para mejorar diversas características. Además, la optimización de las mutaciones silenciosas puede mejorar la expresión de proteínas en una variedad de huéspedes.

## 15 **Evolución de Sinergia**

En una forma de realización de la presente invención, se genera un EvoMap™ y se utiliza para la Evolución de Sinergia, de acuerdo con lo mostrado en la Figura 2. En la Evolución de Sinergia, se puede combinar la mutación simultánea en 2 a 20 sitios seleccionados para producir un efecto combinatorio. El EvoMap™ del polipéptido plantilla se utiliza para seleccionar mutaciones puntuales de aminoácidos individuales específicos para el montaje a mutaciones de polipéptidos de múltiples sitios.

En la Evolución de Sinergia, las mutaciones puntuales de aminoácidos no de desactivación se seleccionan dentro de sitios parcialmente mutables que están cerca de sitios no mutables en el EvoMap™. En un aspecto, las mutaciones puntuales no de desactivación seleccionadas son adyacentes a los sitios no mutables. En la Evolución de Sinergia, la mutación simultánea de aminoácidos en dos a 20 de los sitios seleccionados se lleva a cabo para los efectos combinatorios. En un aspecto, la recombinación de dos a 20 mutaciones seleccionadas se utiliza para producir una biblioteca variante de codón que codifica para una población de polipéptidos mutantes en múltiples sitios. En un aspecto, las mutaciones se confirman por medio de secuenciación de cada nueva molécula. También se pueden emplear otros métodos de confirmación.

Después de la clonación y la expresión, los polipéptidos mutantes de múltiples sitios producidas se criban por al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada en comparación con el polipéptido plantilla. De esta manera, se pueden identificar polipéptidos mutantes mejorados de múltiples sitios. En un aspecto, los polipéptidos mutantes de múltiples sitios se producen por medio de síntesis combinatoria de proteínas. Una ventaja de la Evolución de Sinergia es que no requiere una estructura cristalina de rayos x de proteína para dirigir la evolución del polipéptido plantilla. Esta técnica es útil en particular para proteínas con alta variación de ensayo y otros efectos en múltiples sitios.

De acuerdo con la presente invención, las aplicaciones de la Evolución de Sinergia incluyen, pero no se limitan a, la evolución de los cambios mecánicos moleculares complejos, la evolución de proteínas con alta variación de ensayo, la evolución de la especificidad de proteínas, la mejora de la expresión en varios huéspedes de expresión, la mejora de la actividad catalítica de proteínas, la estabilidad, y la optimización del pH. La Evolución de Sinergia es aplicable a todos los tipos de proteínas terapéuticas, que incluyen, pero no se limitan a, hormonas, enzimas, citoquinas y anticuerpos.

En un aspecto de la presente invención, la Evolución de Sinergia se puede utilizar para optimizar uno o más aspectos de un polipéptido que es una porción de una molécula de proteína. La molécula de proteína se puede ensamblar por medio de la unión de uno o más ácidos nucleicos mutantes que codifican polipéptidos con cero, uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos marco para crear una proteína variante por medio de técnicas de clonación, traducción y expresión conocidas en la técnica. En un aspecto, un polipéptido marco se deriva de una molécula de proteína de tipo salvaje. En este aspecto, la Evolución de Sinergia se puede utilizar en conjunción con técnicas de humanización de anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón se puede seleccionar para la evolución y la humanización. Las regiones CDR del anticuerpo se clonan y se secuencian y las regiones CDR individuales (CDR 1, CDR 2, CDR 3) se pueden sintetizar y ligar a otros nucleótidos que codifican para polipéptidos marco de anticuerpo humano, seguido por la producción de una biblioteca variante de IgG humana. La biblioteca variante de IgG humana se criba a continuación, para por lo menos una propiedad en comparación con el mAb de ratón. En otro aspecto, el polipéptido marco es un polipéptido de andamio artificial. Las técnicas específicas de preparación de fragmentos de ADNbc, la ligación y el montaje de los ácidos nucleicos, la clonación, la transfección, la expresión, la síntesis en fase sólida de bibliotecas, la síntesis en fase de solución de bibliotecas, la evolución posicional comprensiva, la síntesis combinatoria de proteínas, la cuantificación de la expresión por medio de ELISA de Cuantificación y ensayo de  $\beta$ -galactosidasa, y ELISA funcional se presentan en la sección de ejemplos.

En otra forma de realización de la invención, la Evolución de Sinergia se puede utilizar para mejorar la afinidad de unión de un anticuerpo. En esta forma de realización, se puede llevar a cabo la optimización de la región variable de anticuerpo. Por ejemplo, para la producción de anticuerpos mutantes, la CPE se lleva a cabo para las regiones variables cadena ligera y de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado y se genera un EvoMap™. Los mutantes se seleccionan para volver a ensamblar; por ejemplo, se seleccionan variantes de la cadena ligera y se seleccionan variantes de la cadena pesada para el montaje. Las mutaciones puntuales de aminoácidos no de desactivación se seleccionan de dentro de los sitios parcialmente mutables que están cerca de los sitios no mutables. La tecnología de volver a ensamblar que utiliza CPS se puede utilizar para crear una biblioteca de cadenas pesadas. Las variantes de la cadena ligera se pueden combinar con las variantes de cadena pesada, clonarse, expresarse y las variantes se criban como IgG completas a partir de sobrenadantes de líneas celulares de mamíferos. La afinidad de unión para ciertas variantes se evalúa por medio de, por ejemplo, el uso de ELISA, BIAcore y/o ensayos de instrumentación Sapidyne, u otras técnicas conocidas para aquellos con experiencia en la técnica.

### **Evolución Flexible**

En otra forma de realización, la CPE/EvoMap se puede utilizar para identificar y explotar sitios completamente mutables. En un aspecto, la explotación de varios sitios completamente mutables se denomina Evolución Flexible y se utiliza para hacer cambios destinados tales como la introducción de sitios para la glicosilación (por ej., codones para aminoácidos para la glicosilación ligada a N u O; Asn dentro de la secuencia de consenso Asn-Aa-Ser Thr o Ser/Thr) y la conjugación química. La Evolución Flexible también se puede utilizar en el diseño de sitios de escisión de la proteasa, la introducción de etiquetas para la purificación y/o la detección, el etiquetado específico de sitios, y similares. Además, la optimización de codones de mutaciones silenciosas se puede utilizar para la mejora de la expresión de proteínas. En esta forma de realización, denominada Evolución Flexible, luego de la expresión de proteínas, las bibliotecas de polipéptidos mutantes producidos se vuelven a cribar para por lo menos una propiedad, característica o actividad predeterminada en comparación con el polipéptido plantilla. En un aspecto, la propiedad predeterminada incluye la reducción de la agregación de proteína-proteína, la mejora de la estabilidad de proteínas, o el incremento de la solubilidad de proteínas. En otro aspecto, se puede utilizar cualquier sistema de expresión que se glicosila para la introducción de sitios de glicosilación, tales como, por ejemplo, líneas celulares de mamífero, de plantas, de levadura y de insectos.

En la Evolución Flexible, la evaluación de la bioinformática y las estructuras cristalinas de proteínas de rayos x de proteínas relacionadas, o la proteína o polipéptido plantilla, es útil para la optimización de plantillas. En un aspecto, los sitios seleccionados no están en contacto con los residuos. En otro aspecto, la selección de mutaciones de proteínas no superficiales permite un riesgo reducido de inmunogenicidad.

Las aplicaciones de la Evolución Flexible incluyen, poco no se limitan a, la reducción de la agregación de proteína-proteína, mejora de la solubilidad de proteínas, la optimización de la farmacocinética a través de bibliotecas de glicosilación, la optimización de la estructura secundaria y terciaria de proteínas y la desinmunización de sitios antigénicos directamente a través de cualquiera de los conjuntos de mutación o indirectamente a través de enmascaramiento de glicosilación.

En un aspecto de la Evolución Flexible, se utiliza un EvoMap™ para identificar los sitios completamente mutables, la generación de CPS se lleva a cabo con la inserción de residuos de glicosilación a los sitios completamente mutables (o mutaciones silenciosas para efectos de traducción), y el cribado de la biblioteca glicosilada combinatoria se lleva a cabo por medio del análisis analítico (por ej., análisis de Espectroscopia de Masas, Dispersión de Luz Dinámica), la reducción de la inmunogenicidad (por medio de bioinformática o de ensayo), y/o el análisis farmacocinético (por ej., en ratones Foxnlnu).

En un aspecto, la Evolución Flexible se puede utilizar para la desinmunización para eliminar la inmunogenicidad mientras se mantiene la función. La desinmunización de Evolución Flexible se puede llevar a cabo por medio del enmascaramiento de la inmunogenicidad con la glicosilación, la identificación de sustituciones de aminoácidos de espectros de mutación humanos hipersomáticos que pueden eliminar la inmunogenicidad mientras que mantienen la función, la reducción de la dosis para evadir la inmunogenicidad potencial, y la minimización de los cambios de residuos de aminoácidos no superficiales. Además, las bases de datos de inmunogenicidad y algoritmos se pueden utilizar para identificar y reemplazar potenciales epítomos de unión de MHC. En un aspecto, en la predicción de modificación silico se acopla con los datos de la CPE o la CPE combinada con CPS para generar variantes. En un aspecto, las mutaciones se confirman por medio de la secuenciación de cada nueva molécula. También se pueden emplear otros métodos de confirmación.

La propensión reducida a generar epítomos de células T y/o desinmunización se puede medir por medio de técnicas conocidas en la técnica. Con preferencia, la desinmunización de las proteínas se puede ensayar *in vitro* por medio del ensayo de proliferación de células T. En este ensayo, se criban PBMC de donantes que representan > 80% de los alelos HLA-DR en el mundo para la proliferación en respuesta a cualquiera de péptidos de tipo salvaje o desinmunizados. Idealmente la proliferación celular sólo se detecta durante la carga de las células presentadoras de antígeno con péptidos de tipo salvaje. Los ensayos adicionales para la desinmunización incluyen ensayos de

- reestimulación de PBMC *in vitro* en seres humanos (por ej., gamma interferón (TH1) o IL4 (TH2) ELISA). De manera alternativa, la desinmunización se puede probar por medio de la expresión de tetrámeros HLA-DR que representan todos los haplotipos. Con el fin de probar si los péptidos desinmunizados se presentan en los haplotipos HLA-DR, se puede medir la unión de, por ej., péptidos marcados con fluorescencia en PBMC. La medición de HLA de ratones transgénicos de Clase I y Clase II para respuestas a antígeno de destino (por ej., interferón gamma o IL4). De manera alternativa el cribado de bibliotecas de epítipo con células T educadas (MHC I 9 unidades monoméricas; MHC II de 20 unidades monoméricas) a partir de PBMC y/o ensayos de ratones transgénicos. Además, la desinmunización se puede probar por medio de la determinación de si se han generado anticuerpos contra las moléculas desinmunizados después de la administración en pacientes.
- En otra forma de realización, las técnicas de Evolución Flexible de la presente invención se pueden utilizar para la optimización de la expresión. En un aspecto, la presente invención revela la utilización de métodos de manipulación de proteínas para desarrollar variantes de Fc optimizadas por codones de mutación silenciosa con una mejor expresión en células de mamífero. Una mutación silenciosa es una en la que la variación de la secuencia de ADN no da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. En un aspecto, la mutagénesis del codón se lleva a cabo en la región constante para la optimización de la expresión de células de mamífero. Una variante de Fc optimizada por codones con mejores propiedades de expresión mientras que conservan la capacidad para mediar funciones efectoras mejora la producción de anticuerpos terapéuticos. En este aspecto, por ejemplo, una región constante de una molécula de anticuerpo puede evolucionar para el cribado en diferentes huéspedes de expresión, por ejemplo, el cribado de la expresión de líneas celulares de mamíferos por el uso de células CHO, HEK293 y COS-7. Un ejemplo de optimización de la expresión por mutagénesis del codón en la región constante para la expresión de células de mamíferos se muestra en la Figura 3. Cada uno de los niveles de expresión que se muestra es un promedio de 4 puntos de datos, y se confirmó a través de múltiples experimentos. La capacidad de la línea celular múltiple se demostró para el primer mutante probado en sistemas de expresión de líneas celulares HEK293 y CHO.
- Además, el EvoMap™ se puede utilizar para generar modelos moleculares computacionales de 3 dimensiones del oligopéptido, o regiones específicas del mismo, para explorar los mecanismos estructurales implicados en, por ej., la especificidad del anticuerpo-epítipo y la estabilidad. Un EvoMap™ hipotético tridimensional se muestra en la Figura 9.
- La información en el EvoMap también se puede combinar con la información estructural (si está disponible) para seleccionar por ej., únicamente los residuos de superficie para las mutaciones para incrementar la solubilidad/disminuir la agregación.

### **Evolución de Inserción Posicional Comprensiva**

- En una forma de realización, la descripción proporciona métodos para la identificación y el mapeo de polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un polipéptido plantilla. Con referencia a la Figura 4, el uso de un péptido lineal como un simple ejemplo, en un primer paso, un conjunto de variantes naturales de aminoácidos (o un subconjunto de los mismos, o derivados de aminoácidos) para cada codón de la posición 1 a n (n corresponde al número de residuos en la cadena de polipéptidos) se genera por un proceso que en la presente memoria se denomina como la evolución de Inserción Posicional Comprensiva (CPI™).
- En la CPI™, un aminoácido se inserta después de cada aminoácido a lo largo de un polipéptido plantilla uno a la vez para generar un conjunto de polipéptidos alargados. La CPI se puede utilizar para insertar 1, 2, 3, 4, o hasta 5 sitios nuevos a la vez. Cada uno de los 20 aminoácidos se añade en cada nueva posición, uno a la vez, para la creación de un conjunto de 20 moléculas diferentes en cada nueva posición añadida en la plantilla. En este caso, se omite la posición 1, que es la metionina y la invariante. Este procedimiento se repite para cada cadena de polipéptidos de la molécula de destino. Un conjunto mínimo de mutaciones de aminoácidos contiene un solo codón para cada uno de los 20 aminoácidos naturales. En un aspecto, las mutaciones se confirman por medio de la secuenciación de cada nueva molécula. También se pueden emplear otros métodos de confirmación.
- La presente invención se refiere a métodos para la identificación y el mapeo de polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un polipéptido plantilla. De manera típica, el polipéptido consistirá en n residuos de aminoácidos, en el que método comprende (a) la generación de 20 x (n-1) polipéptidos separados, en el que cada polipéptido se diferencia del polipéptido plantilla sólo en que ha insertado después de cada posición en la plantilla cada uno de los 20 aminoácidos uno a la vez (de acuerdo con lo ilustrado en la Figura 1); la confirmación de los cambios por medio de secuenciación o alguna otra técnica; el ensayo de cada polipéptido para por lo menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (b) para cada miembro la identificación de cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla.
- En una forma de realización, una o más regiones se seleccionan para la mutagénesis para agregar una posición a la vez de acuerdo con lo descrito con anterioridad. En tal caso, n representa un subconjunto o región del polipéptido plantilla. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, el anticuerpo completo o una o más regiones

determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo se someten a mutagénesis para añadir una posición a la vez en el polipéptido plantilla después de cada posición.

De este modo, la invención incluye métodos para el mapeo de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una, y con preferencia seis, regiones determinantes de complementariedad (CDR), las CDR juntas consisten en n residuos de aminoácidos, el método comprende (a) la generación de 20 x (n-1) anticuerpos separados, en el que cada anticuerpo se diferencia del anticuerpo plantilla sólo en que ha insertado una única posición predeterminada, una a la vez, después de cada posición en el anticuerpo plantilla; (b) el ensayo de cada conjunto por al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (c) para cada miembro la identificación de cualquier cambio en una propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla. Para los anticuerpos, la propiedad, característica o actividad predeterminada puede ser la afinidad de unión y/o la inmunogenicidad, por ejemplo.

Además, se proporcionan métodos para la producción de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR), la CDR consiste en n residuos de aminoácidos, el método comprende: (a) la generación de 20 x (n-1) anticuerpos separados, en el que cada anticuerpo se diferencia del anticuerpo plantilla sólo en que tiene un aminoácido adicional añadido en una única posición predeterminada de la CDR. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende seis CDR, y juntas las CDR consisten en n residuos de aminoácidos.

En otra forma de realización, los nuevos polipéptidos alargados descritos con anterioridad se mutan de manera adicional y se mapean después del cribado para identificar un cambio en una propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido acortado. De manera típica, el polipéptido alargado consistirá en n residuos de aminoácidos, en el que el método comprende (a) la generación de n (n-1 en el caso en el que el residuo inicial sea metionina) conjuntos separados de polipéptidos, cada conjunto comprende polipéptidos mutantes que tienen un número X de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada del polipéptido; en el que cada conjunto de polipéptidos sólo se diferencia en la única posición predeterminada; el ensayo de cada conjunto por al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; (b) para cada miembro la identificación de cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla; y de manera opcional (c) la creación de un mapa funcional que refleje dichos cambios. Con preferencia, el número de diferentes polipéptidos miembro generado es equivalente a  $n \times X$  (o  $[n-1] \times X$ , como sea el caso).

En la alternativa, el método comprende la generación de una única población que comprende los conjuntos de polipéptidos mutados de los polipéptidos alargados. En esta forma de realización, se criba toda la nueva población, se identifican los miembros individuales, y se genera el mapa funcional.

Se utiliza cada aminoácido de origen natural, y X será 19 (que representa los 20 residuos de aminoácidos de origen natural y se excluye el residuo particular presente en una posición dada del polipéptido plantilla).

Sin embargo, se reconoce que cada sistema de expresión puede sufrir de sesgo de codones, en el que la insuficiencia de reuniones de ARNt puede llevar al estancamiento de la traducción, la terminación prematura de la traducción, el cambio de marco de la traducción y la incorporación errónea de aminoácidos. Por lo tanto, para la optimización de la expresión cada conjunto contiene hasta 61 codones diferentes.

Cada conjunto de aminoácidos a continuación se criba, para por lo menos una característica deseable, tales como la función mejorada; las mutaciones neutrales, las mutaciones inhibitoras y la expresión.

En un aspecto, los polipéptidos alargados se pueden mapear para identificar un cambio en una propiedad, característica o actividad que da como resultado los polipéptidos acortados en relación con el "tipo salvaje". Los datos de cada conjunto se combinan para todo el polipéptido, o "molécula de destino". Los impactos del cribado de los polipéptidos alargados (moléculas de destino) se pueden entonces utilizar para más cadenas de mutagénesis comprensivas y el cribado de acuerdo con lo descrito en la presente memoria. Los datos de la mutagénesis proporcionan un mapa funcional detallado (denominado en la presente memoria como un EvoMap™) de la molécula de destino que se genera. Este mapa contiene información detallada de cómo cada mutación afecta al rendimiento/expresión de la molécula de destino. Permite la identificación de todos los sitios en los que no se pueden llevar a cabo cambios sin una pérdida en la función de la proteína (o de unión en caso de anticuerpos antígeno/receptor). Se muestra también el lugar donde se pueden llevar a cabo cambios sin afectar la función.

### **Evolución de Supresión Posicional Comprensiva**

La Evolución de Supresión Posicional Comprensiva (CPD™) se refiere a métodos para la identificación y el mapeo de polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un polipéptido plantilla. La evolución de CPD suprime todos los aminoácidos a lo largo de la proteína una posición a la vez. De manera típica, el polipéptido consistirá en n

residuos de aminoácidos, en el que el método comprende (a) la generación de n-1 (n-2 en el caso en el que el residuo inicial sea metionina) polipéptidos separados, en el que cada polipéptido se diferencia del polipéptido plantilla en que carece de una única posición predeterminada; la confirmación de los cambios por medio de secuenciación o alguna otra técnica; el ensayo de cada polipéptido para por lo menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (b) para cada miembro la identificación de cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla.

En una forma de realización de la evolución de CPD, una o más regiones se seleccionan para la mutagénesis para eliminar una posición a la vez. En tal caso, n representa un subconjunto o región del polipéptido plantilla. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, el anticuerpo completo o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo se someten a mutagénesis para eliminar una posición a la vez en el polipéptido plantilla. En un aspecto, las mutaciones se confirman por medio de secuenciación de cada nueva molécula. También se pueden emplear otros métodos de confirmación.

En una forma de realización, CPD de este modo incluye métodos para el mapeo de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una, y con preferencia seis, regiones determinantes de complementariedad (CDR), las CDR juntas consisten en n residuos de aminoácidos, el método comprende (a) la generación de (n-1) anticuerpos separados, en el que cada anticuerpo se diferencia del anticuerpo plantilla en que carece de una única posición predeterminada; (b) el ensayo de cada conjunto por al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (c) para cada miembro la identificación de cualquier cambio en una propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla. Para los anticuerpos, la propiedad, característica o actividad predeterminada puede ser la afinidad de unión y/o la inmunogenicidad, por ejemplo.

Un aspecto de la evolución de CPD incluye métodos de producción de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR), la CDR consiste en n residuos de aminoácidos, el método comprende: (a) la generación de n-1 anticuerpos separados, en el que cada anticuerpo se diferencia del anticuerpo plantilla en que carece de una única posición predeterminada de la CDR. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende seis CDR, y juntas las CDR consisten en n residuos de aminoácidos.

En otra forma de realización de la evolución de CPD, los nuevos polipéptidos acortados descritos con anterioridad se mutan de manera adicional y se mapean después del cribado para identificar un cambio en una propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido acortado. De manera típica, el polipéptido acortado consistirá en n residuos de aminoácidos, en el que el método comprende (a) la generación de n (n-1 en el caso en el que el residuo inicial sea metionina) conjuntos separados de polipéptidos, cada conjunto comprende polipéptidos miembro que tienen un número X de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada del polipéptido; en el que cada conjunto de polipéptidos se diferencia en la única posición predeterminada; el ensayo de cada conjunto por al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; (b) para cada miembro la identificación de cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla; y (c) la creación de un mapa funcional que refleje dichos cambios. Con preferencia, el número de diferentes polipéptidos miembro generado es equivalente a  $n \times X$  (o  $[n-1] \times X$ , como sea el caso).

En la alternativa, el método de CPD comprende la generación de una única población que comprende los conjuntos de polipéptidos mutados de los polipéptidos acortados. En esta forma de realización, se criba toda la nueva población, se identifican los miembros individuales, y se genera el mapa funcional. Se utiliza cada aminoácido de origen natural, y X será 19 (que representa los 20 residuos de aminoácidos de origen natural y se excluye el residuo particular presente en una posición dada del polipéptido plantilla).

Se puede utilizar cualquier medio de mutación o sintético para generar el conjunto de mutantes en la evolución de CPD. En una forma de realización, la generación de polipéptidos comprende (i) el sometimiento de un polinucleótido que contiene codones que codifica para el polipéptido plantilla para la amplificación basada en polimerasa por el uso de un oligonucleótido degenerado 64 veces para cada codón a mutagenizar, en el que cada uno de los oligonucleótidos degenerados 64 veces está compuesto por una primera secuencia homóloga y una secuencia triplete N,N,N degenerada, con el fin de generar un conjunto de polinucleótidos de progeñe; y (ii) el sometimiento del conjunto de polinucleótidos de progeñe a la amplificación clonal de manera tal que se expresen los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de progeñe.

En una forma de realización de la evolución de CPD, todo el polipéptido acortado se somete a mutagénesis comprensiva. En otra forma de realización, una o más regiones se seleccionan para la mutagénesis comprensiva. En tal caso, n representa un subconjunto o región del polipéptido plantilla. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, el anticuerpo completo o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo se someten a mutagénesis comprensiva.



Por lo tanto, la revelación de la evolución de CPD incluye métodos para el mapeo de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo plantilla acertado que tiene por lo menos una, y con preferencia seis, regiones determinantes de complementariedad (CDR), las CDR juntas consisten en n residuos de aminoácidos, el método comprende (a) la generación de n conjuntos separados de anticuerpos, cada conjunto comprende anticuerpos miembro que tienen un número X de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada de la CDR; en el que cada conjunto de anticuerpos se diferencia en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos miembro diferentes generados es equivalente a  $n \times X$ ; (b) el ensayo de cada conjunto por al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; (c) para cada miembro la identificación de cualquier cambio en una propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla; y (d) la creación de un mapa posicional estructural de tales cambios. Para los anticuerpos, la propiedad, característica o propiedad predeterminada puede ser afinidad de unión y/o inmunogenicidad. De acuerdo con lo expuesto con anterioridad, en la alternativa, se puede generar una única población que comprende todos los conjuntos de anticuerpos mutados.

Además, se proporcionan métodos para la producción de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo plantilla acertado que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR), la CDR consiste en n residuos de aminoácidos, el método comprende: (a) la generación de n conjuntos separados de anticuerpos, cada conjunto comprende anticuerpos miembro que tienen un número X de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada de la CDR; en el que cada conjunto de anticuerpos se diferencia en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos miembro diferentes generado es equivalente a  $n \times X$ . En otra forma de realización, el anticuerpo comprende seis CDR, y juntas las CDR consisten en n residuos de aminoácidos.

El método de evolución de CPD™ incluye un mapa posicional funcional (EvoMap™) hecho por los métodos descritos en la presente memoria. En una forma de realización adicional, ciertos residuos en particular sensibles al cambio se pueden indicar de este modo en el EvoMap™. Se puede implementar una optimización adicional por medio de cambios mutacionales adicionales en las posiciones fuera de estas posiciones sensibles. También es posible utilizar el EvoMap™ con el fin de reconocer y recombinar las sustituciones de aminoácidos individuales beneficiosas, y cribarlas para optimizar aún más las características deseadas en la molécula de destino, en un proceso llamado Síntesis Combinatoria de Proteínas (CPS™).

### Síntesis Combinatoria de Proteínas

La Síntesis Combinatoria de Proteínas (CPS™) implica la combinación de impactos individuales de CPE, CPI, CPD, o cualquier otra técnica evolutiva para sintetizar proteínas con mutaciones combinadas que luego se criban para detectar características de genes y proteínas optimizadas. Por lo general, los mutantes mejorados o las mutaciones neutrales de otras técnicas de evolución se combinan en CPS. Un esquema de CPS se muestra en la Figura 8. La CPS comprensiva se refiere a tomar todos los mutantes mejorados seleccionados teóricos y generar todas las combinaciones y secuenciarlas antes del cribado de actividad/expresión para asegurar que existan los clones en el conjunto y para determinar si se pueden expresar en el sistema. En esencia, en todas las proteínas habrá mutantes que expresan niveles insuficientes para la detección de la actividad y estos necesitan ser anotados para la Síntesis de Proteínas Comprensiva y el cribado, es decir, el proceso de CPS.

En una forma de realización CPE es seguido por CPS para crear mutantes, que se criban para detectar la propiedad deseada. En un aspecto, el tiempo y los recursos se pueden ahorrar en el proceso de CPE por medio del cambio de 2 aa o 3 aa o 4 aa a la vez frente a uno a la vez; por lo que si el número de aa de la proteína es N, el número total generado y cribado para 2 aa a la vez sería  $(20^2) \times \frac{1}{2}N$ ; 3 a la vez sería  $(20^3) \times \frac{1}{3}N$ , etc. Por ejemplo, en un aspecto específico, (en el ejemplo de 2 aa): el 1er aa en la posición del 1er aa se combina con todos los 20 en la posición del 2do aa y todos los demás aa siguen siendo los mismos, entonces el 2do aa en la posición del 1er aa se combina con todos los 20 en la posición del 2do aa y todos los demás aa de siguen siendo los mismos. Toda la población se criba para detectar mutantes mejorados y luego se lleva a cabo la mutación en el segundo conjunto de los dos siguientes aa en la línea. En un aspecto similar, esto se puede llevar a cabo para 3 aa a la vez o 4 aa a la vez. En otro aspecto, de manera opcional se sigue el proceso de CPE con CPS de mutantes mejorados (que incluyen cualquier subconjunto de los mismos).

En un aspecto, se pueden incorporar aminoácidos no naturales en el proceso (para todos los otros 19 aminoácidos, además de los aminoácidos no naturales) por el uso de tecnologías novedosas tales como el codón de cuadruplete que se describe en los documentos adjuntos y relacionados. Neumann *et al.* *Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome.* *Nature* 464, 441 a 444 (14 de febrero de 2010). En este aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS se lleva a cabo para la incorporación de aminoácidos no naturales. En otro aspecto, se puede utilizar la informática después de la CPE o la CPE combinada con CPS para añadir otros aminoácidos naturales o no naturales.

En un aspecto adicional, la biblioteca completa de CPE se crea de manera sintética (para sintetizar todas las moléculas en las máquinas disponibles en el mercado). En el caso de que la máquina de síntesis no pueda crear

cadena lo suficientemente grandes, los fragmentos se sintetizan y después se ligan para generar moléculas de longitud completa. Esta biblioteca se criba y se sigue con CPS para combinar mutaciones deseadas. Este es un proceso de dos pasos en el que CPE es seguido por CPS, no un paso de sólo la CPE.

5 En otro aspecto, una biblioteca de CPE se genera y se criba, a continuación, seguido por CPS que combina mutantes mejorados de la siguiente manera: si hay 10 mutantes mejorados, probar una sola molécula con los 10 cambios, luego probar todas las versiones de 9 mutaciones, a continuación, 8, 7, 6, 5 etc., hasta que uno de los grupos no encuentre una molécula mejorada por encima de las demás en el grupo anterior. Una vez que se identifica una molécula mejorada se puede terminar el proceso.

10 En un aspecto adicional, la CPE se lleva a cabo para identificar mutantes mejorados y mutaciones neutrales para la afinidad y la expresión, a continuación, la CPS se lleva a cabo con combinaciones de mutantes mejorados y mutaciones neutrales, y la biblioteca se criba de nuevo para otras mejoras en las características tales como la función, la afinidad y/o la expresión.

En un aspecto adicional, la CPE se lleva a cabo en codones de la Fc o de otro dominio para cambios de glicosilación.

15 En otro aspecto, se puede llevar a cabo la CPE o la CPE combinada con CPS de microARN o intrones.

En un aspecto adicional, se lleva a cabo la CPE o la CPE combinada con CPS de CDR de anticuerpo de roedor, y luego se criba para mutantes mejorados, seguido por humanización.

20 En un aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS se lleva a cabo para producir nucleótidos alternativos intermedios que conducen a la mutación deseada en la reacción final, por ejemplo, una citosina metilada que se convierte en un uracilo.

En un aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS además de la informática se utiliza para la conversión de CDR de ratón a CDR de humano y viceversa.

En un aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS se utiliza con 2 y 3 mutaciones espaciadas a lo largo de la proteína.

25 En otro aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS se llevan a cabo en cadenas pesadas y cadenas ligeras en un vector de cadena doble para el cribado de evaluación para una mayor sensibilidad.

En un aspecto adicional, se llevan a cabo la CPE o la CPE combinada con CPS y las moléculas se criban para la selección de cambios alostéricos en una molécula.

30 En un aspecto, cualquiera de las técnicas de evolución de la revelación puede comprender la síntesis química de oligonucleótidos. Por ejemplo, las Tecnologías de ADN Integradas (Coralville, IA) pueden sintetizar oligonucleótidos de alta fidelidad conocidos como "ULTRAmers™" de hasta 200 bases de longitud, y hasta 300 unidades monoméricas, con la confirmación de control de calidad que utiliza la tecnología ESI-LCMS.

35 Se puede utilizar cualquiera de varias técnicas de detección para evaluar los mutantes de la CPE o la CPE combinada con CPS. En un aspecto, los mutantes de la CPE o la CPE combinada con CPS se pueden secretar y presentar en huéspedes de mamífero. De manera alternativa, los mutantes de la CPE o la CPE combinada con CPS se pueden producir en *E. coli* y cribarse en huéspedes de mamífero. En otro aspecto, la CPE se lleva a cabo a partir de 15 aa o 10 aa y seguido por CPS; luego se sigue con el resto de los 19 aa restantes. En otro aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS se utiliza para la evolución de las proteínas de manera específica con cambios de aminoácidos no superficiales. En un aspecto, la CPE para se puede utilizar para el mapeo de epítopos de múltiples dimensiones. En otro aspecto, el cribado de la CPE o la CPE combinada con CPS se puede llevar a cabo de manera transitoria en células de mamífero. En un aspecto preferido, se lleva a cabo CPE, a continuación, se lleva a cabo la secuenciación y la matriz de todos los clones, por ejemplo, en un formato basado en chips o basado en pocillo para la expresión y el cribado. En otro aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS se utiliza para la evolución de coordinación de iones metálicos por medio de la selección en diferentes concentraciones de iones. En un aspecto adicional, se lleva a cabo la CPE o la CPE combinada con CPS, y las proteínas se expresan y se criban en condiciones libres de células y en organismos vivos no humanos. En un aspecto, el cribado de la CPE o la CPE combinada con CPS de las células madre se lleva a cabo para los efectos variables sobre la diferenciación y la proteína y la expresión de ARN y de ARNm. En un aspecto adicional, el cribado múltiple de la CPE o la CPE combinada con CPS se lleva a cabo para múltiples características de proteínas como la expresión y la unión. En otro aspecto, la CPE o la CPE combinada con CPS se llevan a cabo en moléculas plantilla implicadas en el transporte cerebral y el cruce de membranas; y los mutantes se criban para detectar características mejoradas. En un aspecto, los mutantes de la CPE o la CPE combinada con CPS se criban para detectar características higroscópicas de

proteínas. En otro aspecto, los mutantes de la CPE o la CPE combinada con CPS se ensayan para la selección de proteínas dinámicas. En un aspecto, el cribado de la CPE o la CPE combinada con CPS se lleva a cabo fuera de la condición de destino para identificar mutantes dentro de la condición de destino y viceversa.

5 En una forma de realización, cualquiera de los aspectos anteriores de la CPE o la CPE combinada con CPS se utilizan en combinación con un método seleccionado de CPI, CPD, y CPD con combinación de CPI.

En otra forma de realización, cualquiera de los aspectos anteriores de la CPE o la CPE combinada con CPS se utilizan en combinación con un método seleccionado de Evolución Flexible y Evolución de Sinergia llevadas a cabo a partir de una plantilla.

10 El término "plantilla" se puede referir a un polipéptido base o un polinucleótido que codifica tal polipéptido. De acuerdo con lo que aquéllos con experiencia en esta técnica apreciarán, cualquier plantilla se puede utilizar en los métodos y las composiciones de la presente invención. Las plantillas que se pueden mutar y de este modo evolucionar se pueden utilizar para guiar la síntesis de otro polipéptido o una biblioteca de polipéptidos de acuerdo con lo descrito en la presente invención. De acuerdo con lo descrito en más detalle en la presente memoria, la  
15 plantilla evolucionable codifica la síntesis de un polipéptido y se puede utilizar más tarde para decodificar la historia sintética del polipéptido, para amplificar indirectamente el polipéptido, y/o para evolucionar (es decir, diversificar, seleccionar y amplificar) el polipéptido. La plantilla evolucionable es, en ciertas formas de realización, un ácido nucleico. En cierta forma de realización de la presente invención, la plantilla se basa en un ácido nucleico. En otras formas de realización, la plantilla es un polipéptido.

20 Las plantillas de ácido nucleico utilizadas en la presente invención están hechas de ADN, ARN, un híbrido de ADN y ARN, o un derivado de ADN y ARN, y pueden ser de cadena sencilla o doble. La secuencia de la plantilla se utiliza para codificar la síntesis de un polipéptido, con preferencia un compuesto que no es, o no se parece a, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico (por ej., un polímero no natural o una molécula pequeña). En el caso de ciertos polímeros no naturales, la plantilla de ácido nucleico se utiliza para alinear las unidades de monómero en la  
25 secuencia en que aparecerán en el polímero y para que estén en estrecha proximidad con unidades de monómero adyacentes a lo largo de la plantilla de manera tal que van a reaccionar y unirse por medio de un enlace covalente. En ciertas otras formas de realización, la plantilla se puede utilizar para generar polímeros no naturales por medio de amplificación por PCR de una biblioteca de plantillas de ADN sintético que consiste en una región aleatoria de nucleótidos.

30 Se apreciará que la plantilla puede variar en gran medida en el número de bases. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, la plantilla puede ser de 10 a 10.000 bases de longitud, con preferencia entre 10 y 1.000 bases de longitud. La longitud de la plantilla, por supuesto, dependerá de la longitud de los codones, la complejidad de la biblioteca, la longitud del polímero no natural que se sintetiza, la complejidad de la molécula pequeña a ser sintetizada, el uso de secuencias de espacio, etc. La secuencia de ácido nucleico se puede preparar por el uso de  
35 cualquier método conocido en la técnica para preparar secuencias de ácidos nucleicos. Estos métodos incluyen métodos tanto *in vivo* como *in vitro*, que incluyen PCR, la preparación de plásmidos, la digestión con endonucleasas, la síntesis en fase sólida, la transcripción *in vitro*, la separación de las cadenas, etc. En ciertas formas de realización, la plantilla de ácido nucleico se sintetiza por el uso de un sintetizador de ADN automatizado.

40 De acuerdo con lo discutido con anterioridad, en ciertas formas de realización de la invención, el método se utiliza para sintetizar polipéptidos que no son, o no parecen, ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos. De este modo, en ciertas formas de realización de la presente invención, la plantilla de ácido nucleico comprende secuencias de bases que codifican la síntesis de un polímero no natural o una molécula pequeña. El mensaje codificado en la  
45 plantilla de ácido nucleico con preferencia comienza con un codón específico que lleva en su lugar un sitio químicamente reactivo a partir del cual puede tener lugar la polimerización, o en el caso de la síntesis de una molécula pequeña el codón de "inicio" puede codificar para un anti-codón asociado con un andamio de molécula pequeña o un primer reactivo. El codón de "inicio" de la presente invención es análogo al codón de "inicio", ATG, que codifica para el aminoácido metionina.

50 En aún otras formas de realización de la invención, la plantilla de ácido nucleico en sí se puede modificar para incluir un sitio de iniciación para la síntesis de polímero (por ej., un nucleófilo) o un andamio de molécula pequeña. En ciertas formas de realización, la plantilla de ácido nucleico incluye un bucle de horquilla en uno de sus extremos que termina en un grupo reactivo utilizado para iniciar la polimerización de las unidades de monómero. Por ejemplo, una  
55 plantilla de ADN puede comprender un bucle de horquilla que termina en un grupo 5'-amino, que puede estar protegido o no. Desde el grupo amino puede comenzar la polimerización del polímero no natural. El grupo amino reactivo también se puede utilizar para enlazar un andamio de molécula pequeña sobre la plantilla de ácido nucleico con el fin de sintetizar una biblioteca de moléculas pequeñas.

Para terminar la síntesis del polímero no natural un codón de "terminación" se debe incluir en la plantilla de ácido nucleico con preferencia en el extremo de la secuencia de codificación. El codón de "terminación" de la presente invención es análogo a los codones de "terminación" (es decir, TAA, TAG, TGA) encontrado en los transcritos de

ARNm. Estos codones conducen a la terminación de la síntesis de proteínas. En ciertas formas de realización, se elige un codón de "terminación" que sea compatible con el código genético artificial utilizado para codificar el polímero no natural. Por ejemplo, el codón de "terminación" no debe entrar en conflicto con otros codones utilizados para codificar la síntesis, y debe ser del mismo formato general que los otros codones utilizados en la plantilla. El codón de "terminación" puede codificar para una unidad de monómero que termina la polimerización al no proporcionar un grupo reactivo para su posterior fijación. Por ejemplo, una unidad de monómero de terminación puede contener un grupo reactivo bloqueado tal como un acetamida en lugar de una amina primaria. En aún otras formas de realización, la unidad de monómero de terminación comprende un terminal biotinilado que proporciona una forma conveniente de terminar el paso de polimerización y la purificación del polímero resultante.

En una forma de realización, los productos de ADN mutagenizadas se utilizan directamente como plantilla para la síntesis *in vitro* de las correspondientes proteínas mutantes. Debido a la alta eficiencia con la que se pueden generar todas las sustituciones de 19 aminoácidos en un único residuo, es posible llevar a cabo la mutagénesis comprensiva en numerosos residuos de interés, ya sea de manera independiente o en combinación con otras mutaciones dentro de la proteína. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, la mutagénesis de "saturación completa" se define como la sustitución de un aminoácido dado en una proteína, con los otros 19 aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, la mutagénesis de saturación del sitio del gen, que explora de manera sistemática y mínima todas las posibles sustituciones de un solo aminoácido a lo largo de una secuencia de proteína, se revela en Kretz *et al.*, *Methods in Enzymology*, 2004, 388:3 a 11; Short, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.171.820; y Short, Patente de los Estados Unidos Núm. 6.562.594, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria. Sin embargo, estas técnicas de saturación se basan en métodos estadísticos y la mutagénesis de saturación no se confirma por medio de secuenciación para asegurar que se han llevado a cabo todas las mutaciones deseadas.

En un aspecto, esta invención proporciona el uso de cebadores de codones (que contienen una secuencia degenerada N,N,G/T) para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, con el fin de generar un conjunto de polipéptidos de progenie en la que una gama completa de sustituciones de aminoácidos individuales se representa en cada posición de aminoácido (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.171.820; véase también la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.677.149, cada una se incorpora como referencia en la presente memoria). Los oligos utilizados están compuestos de manera contigua por una primera secuencia homóloga, una secuencia degenerada N,N,G/T, y con preferencia, pero no necesariamente una segunda secuencia homóloga. Los productos de la traducción de la progenie corriente abajo del uso de tales oligos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácidos a lo largo del polipéptido, debido a la degeneración de la secuencia N,N,G/T incluye los codones para los 20 aminoácidos.

El uso de codones es uno de los factores importantes en la expresión génica de mamífero. Las frecuencias con las que se utilizan diferentes codones varían de manera significativa entre diferentes huéspedes, y entre proteínas expresadas a niveles altos o bajos dentro del mismo organismo. La razón más probable para esta variación es que los codones preferidos se correlacionan con la abundancia de ARNt afines disponibles dentro de la célula. Es posible que las concentraciones de uso de codones y ARNt aceptores hayan evolucionado de manera conjunta y que la presión de selección para esta evolución de manera conjunta es más pronunciada para los genes altamente expresados que los genes expresados en niveles bajos.

En un aspecto, uno de tales oligos degenerados (compuesto por un casete degenerado N,N,G/T) se utiliza para el sometimiento de cada codón original en una plantilla de polinucleótido parental a una gama completa de sustituciones de codones. En otro aspecto, se utilizan por lo menos dos casetes degenerados N,N,G/T, ya sea en el mismo oligo o no, para el sometimiento de por lo menos dos codones originales en una plantilla de polinucleótido parental a una gama completa de sustituciones de codones. Por lo tanto, más de una secuencia N,N,G/T puede estar contenida en un oligo para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N,G/T pueden ser directamente contiguas, o separadas por una o más secuencias de nucleótidos. En otro aspecto, los oligos reparables para la introducción de adiciones y supresiones se pueden utilizar ya sea solos o en combinación con los codones que contienen una secuencia N,N,G/T, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de casetes degenerados que tienen menos degeneración de la secuencia N,N,G/T. Por ejemplo, en algunos casos puede ser deseable utilizar (por ej., en un oligo) una secuencia triplete degenerada compuesta por sólo un N, en el que dicho N puede estar en la primera, la segunda o la tercera posición del triplete. Se pueden utilizar cualesquiera otras bases, que incluyen posibles combinaciones y permutaciones de las mismas en las dos posiciones restantes del triplete. De manera alternativa, en algunos casos puede ser deseable utilizar (por ej., en un oligo) una secuencia triplete degenerada N,N,N.

Sin embargo, se aprecia que el uso de un triplete degenerado N,N,G/T de acuerdo con lo descrito en la presente memoria es ventajoso por varias razones. En un aspecto, esta invención proporciona un medio para generar de manera sistemática y con bastante facilidad la sustitución de la gama completa de posibles aminoácidos (para un total de 20 aminoácidos) en todas y cada posición de aminoácido en un polipéptido. Por lo tanto, para un polipéptido

de 100 aminoácidos, la presente invención proporciona una manera de generar de manera sistemática y con bastante facilidad 2000 especies distintas (es decir, 20 posibles aminoácidos por posición X 100 posiciones de aminoácidos). Se aprecia que se proporciona, a través del uso de un oligo que contiene un triplete degenerado N,N,G/T, 32 secuencias individuales que codifican para 20 aminoácidos posibles. De este modo, en un recipiente de reacción en el que una secuencia de polinucleótidos parental se somete a mutagénesis de saturación por el uso de uno de tales oligo, se generan 32 polinucleótidos de progenie distintos que codifican 20 polipéptidos distintos. En contraste, el uso de un oligo no degenerado en la mutagénesis dirigida al sitio conduce a un único producto de polipéptido de progenie por recipiente de reacción.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, cada recipiente de reacción de mutagénesis de saturación contiene polinucleótidos que codifican por lo menos 20 moléculas de polipéptidos de progenie de manera tal que todos los 20 aminoácidos se representan en la posición de un aminoácido específico que corresponde a la posición de codón mutagenizada en el polinucleótido parental. Los polipéptidos de progenie degenerados 32 veces generados a partir de cada recipiente de reacción de mutagénesis de saturación se pueden someter a la amplificación clonal (por ej., clonarse en un huésped adecuado de *E. coli* por el uso de un vector de expresión) y someterse a cribado de expresión. Cuando un polipéptido de progenie individual se identifica por medio del cribado para presentar un cambio en la propiedad (cuando se compara con el polipéptido plantilla), se puede secuenciar para identificar la sustitución de aminoácidos responsable de tal cambio contenido en la misma.

El polipéptido plantilla puede ser cualquier proteína, sin embargo, se prefieren las proteínas que tienen un ensayo conveniente para la actividad tales como la actividad catalítica o de unión de ligandos. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, un ligando es cualquier molécula que se une de manera específica a una más grande, tal como una molécula pequeña que se une a una proteína. Los ejemplos representativos de las interacciones de destino incluyen la catálisis, las interacciones enzima-sustrato, las interacciones proteína-ácido nucleico, las interacciones receptor-ligando, las interacciones proteína-metal y las interacciones anticuerpo-antígeno. Las proteínas de destino representativas incluyen enzimas, anticuerpos, citoquinas, receptores, proteínas de unión a ADN, agentes quelantes, y hormonas.

Se puede utilizar cualquier método mutagénico sintético o recombinante químico para generar la población de polipéptidos mutantes. La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ej., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2da Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (*Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Culture of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., Nueva York); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Cabs eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu *et al.* eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook of Experimental Immunology*, Volúmenes I a IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1986).

En una forma de realización, el polipéptido plantilla es un anticuerpo. El anticuerpo se somete a los métodos descritos en la presente memoria para, por ejemplo, mapear y entender qué posiciones dentro de la afinidad de unión efectúan la CDR o qué posiciones en el Fc afectan a la expresión. Las técnicas para la preparación y el uso de diversos constructos basados en anticuerpos y fragmentos de los mismos son muy conocidos en la técnica. Un aspecto importante de la presente invención es la identificación de residuos que juegan, o son propensos a jugar, un papel en la interacción de interés (por ej., la interacción antígeno-anticuerpo, la quelación metálica, la unión al receptor, la unión al sustrato, etc.). Se puede utilizar cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

En una forma de realización, se puede utilizar cualquiera de las plataformas de evolución CPE, CPI, CPD y CPS para la generación de anticuerpos agonistas, es decir, anticuerpos de activación. Estas tecnologías de evolución permiten la generación de anticuerpos agonistas más allá de la activación de tipo reticulación de proteínas más simple y, en particular, permiten la activación de receptores tales como GPL-1 o 2 que de manera tradicional se activan por medio de péptidos.

En un aspecto, los anticuerpos son seleccionados por FACS o microscopía o equivalente para activar débilmente anticuerpos por el uso de células con señales fluorescentes que emiten fluorescencia cuando se activa el receptor de la superficie celular. Posteriormente, las herramientas de evolución se utilizan para mejorar esta activación. La tecnología de CPS entonces se utiliza para combinar los mutantes mejorados.

En otro aspecto, se selecciona un anticuerpo que se une al sitio de activación del receptor de acuerdo con lo

determinado por el mapeo de epítomos. Se utilizan técnicas de CPE, CPI y/o CPD para seleccionar los mutantes que provocan la estimulación del receptor de acuerdo con lo determinado por una lectura intracelular tal como la fluorescencia en respuesta a la liberación de iones de calcio u otros ensayos que son muy conocidos en la técnica. La tecnología de CPS entonces se utiliza para combinar los mutantes mejorados.

- 5 En un aspecto particular, algunas de las ventajas clave de CPI con inserciones de aminoácidos simples, dobles o triples son que estos aminoácidos insertados se pueden extender en el bolsillo de unión del receptor para activar el receptor. En otro aspecto particular, la CPD puede remodelar y/o cambiar la posición de los aminoácidos que interactúan con el receptor para mejorar o efectuar la activación y finalmente la CPE puede llevar a cabo cambios relativamente pequeños para efectuar la activación del receptor.
- 10 La especificidad de un anticuerpo está determinada por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) dentro de las regiones variables de cadena ligera (VL) y las regiones variables de cadena pesada (VH). El fragmento Fab de un anticuerpo, que es aproximadamente un tercio del tamaño de un anticuerpo completo contiene las regiones variables de cadena pesada y ligera, la región constante de cadena ligera completa y una porción de la región constante de cadena pesada. Las moléculas Fab son estables y se asocian bien debido a la contribución de las secuencias de región constante. Sin embargo, el rendimiento de Fab funcional expresado en sistemas bacterianos es menor que el del fragmento Fv más pequeño que contiene sólo las regiones variables de cadena pesada y ligera. El fragmento Fv es la porción más pequeña de un anticuerpo que aún conserva un sitio de unión de antígeno funcional. El fragmento Fv tiene las mismas propiedades de unión que el Fab, sin embargo, sin la estabilidad conferida por las regiones constantes, las dos cadenas del Fv se pueden disociar con relativa facilidad en condiciones diluidas.
- 15
- 20

En un aspecto, las regiones VH y VL pueden estar fusionadas por medio de un ligador de polipéptido (Huston *et al.*, 1991) para estabilizar el sitio de unión de antígeno. Este fragmento Fv de polipéptido individual se conoce como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv). Las VH y VL se pueden arreglar con cualquier dominio primero. El enlazador une el extremo carboxi de la primera cadena al extremo amino terminal de la segunda cadena.

- 25 Aquéllos con experiencia en la técnica reconocerán que los fragmentos Fv o Fab de cadena pesada o ligera, o los anticuerpos de cadena sencilla también se pueden utilizar con este sistema. Una cadena pesada o ligera se puede mutagenizar seguido por la adición de la cadena complementaria a la solución. Las dos cadenas se dejan combinar y formar un fragmento de anticuerpo funcional. La adición de secuencias de cadena ligera o pesada no específicas aleatorias permite la producción de un sistema de combinatoria para generar una biblioteca de diversos miembros.
- 30 Por lo general, se genera un polinucleótido de expresión. Este polinucleótido de expresión contiene: (1) un casete de anticuerpo que consiste en un dominio de V<sub>H</sub>, un péptido espaciador y un dominio de V<sub>L</sub> unido de manera operativa para codificar un anticuerpo de cadena sencilla, (2) un promotor adecuado para la transcripción *in vitro* (por ej., un promotor T7, un promotor SP6, y similares) unido de manera operativa para asegurar una transcripción *in vitro* del casete de anticuerpo de cadena sencilla que forma un ARNm que codifica un anticuerpo de cadena sencilla, y (3) una secuencia de terminación de la transcripción adecuado para funcionar en una reacción de transcripción *in vitro*. De manera opcional, el polinucleótido de expresión también puede comprender un origen de replicación y/o un marcador seleccionable. Un ejemplo de un polinucleótido de expresión adecuado es pLM166.
- 35

- Las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden obtener de manera conveniente a partir de una biblioteca de secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> producida por medio de amplificación por PCR por el uso de cebadores específicos de la familia de genes V o cebadores específicos de genes V (Nicholls *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 1993, 165: 81; la Patente WO93/12227) o están diseñados de acuerdo con métodos conocidos en la técnica estándar basados en la información de secuencia disponible. De manera típica, las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de ratón o humano están aisladas. Las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> a continuación se ligan, por lo general con una secuencia espaciadora que interviene (por ej., que codifica un espaciador de péptidos flexible en marco), para formar un casete que codifica un anticuerpo de cadena sencilla. De manera típica, se utiliza una biblioteca que comprende una pluralidad de secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> (algunas veces también con una pluralidad de especies de péptido espaciador representada), en la que la biblioteca se construye con una o más de las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> mutadas para incrementar la diversidad de secuencias en particular en los residuos de CDR, algunas veces en los residuos del marco. Las secuencias de la región V se pueden clonar de manera conveniente como ADNc o productos de amplificación de PCR para células que expresan la inmunoglobulina. Por ejemplo, se pueden utilizar células de hibridoma humano, o linfoma, u otra línea celular que sintetiza ya sea la superficie celular o la inmunoglobulina secretada para el aislamiento de poliA + ARN. El ARN se utiliza a continuación para la síntesis de ADNc cebado por oligo dT por el uso de la enzima transcriptasa inversa (para métodos generales véase, Goodspeed *et al.*, *Gene* 1989, 76:1; Dunn *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1989, 264: 13057). Una vez que se aísla el ADNc de la región V o el producto de PCR, se clona en un vector para formar un casete de anticuerpo de cadena sencilla.
- 40
- 45
- 50
- 55

Para llevar a cabo la construcción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, se aíslan e identifican los genes de codificación. Los genes se pueden modificar para permitir la clonación en un vector de expresión o una transcripción/traducción *in vitro*. Si bien se pueden utilizar métodos tales como las sondas del ADN para VH y VL a

partir de ADNc de hibridoma (Maniatis *et al.*, 1982) o la construcción de un gen sintético para VH y VL (Barbas *et al.*, 1992), un modo conveniente es utilizar métodos dirigidos para amplificar las secuencias de anticuerpos. Una población diversa de genes de anticuerpos se puede amplificar a partir de una muestra de plantilla por medio del diseño de cebadores con las secuencias conservadas en el terminal 3' y 5' de la región variable conocida como el marco o a las regiones constantes del anticuerpo (Iverson *et al.*, 1989). Dentro de los cebadores, se pueden colocar sitios de restricción para facilitar la clonación en un vector de expresión. Al dirigir los cebadores a estas regiones conservadas, la diversidad de la población de anticuerpos se mantiene para permitir la construcción de diversas bibliotecas. Las especies específicas y la clase de anticuerpo se pueden definir por la selección de las secuencias de cebadores de acuerdo con lo ilustrado por el gran número de secuencias para todos los tipos de anticuerpos dados en Kabat *et al.*, 1987, que se incorporan como referencia en la presente memoria.

El ARN mensajero aislado del bazo o sangre periférica de un animal se puede utilizar como la plantilla para la amplificación de una biblioteca de anticuerpos. En ciertas circunstancias, en las que es deseable mostrar una población homogénea de fragmentos de anticuerpos en la superficie celular, el ARNm se puede aislar a partir de una población de anticuerpos monoclonales. El ARN mensajero de cualquier fuente se puede preparar por métodos estándar y utilizarse directamente o para la preparación de una plantilla de ADNc. La generación de ARNm para propósitos de clonación de anticuerpos se lleva a cabo con facilidad siguiendo los procedimientos muy conocidos para la preparación y la caracterización de anticuerpos (véase, por ej., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988; que se incorpora como referencia en la presente memoria).

La generación de anticuerpos monoclonales (MAbs, por su sigla en inglés) por lo general sigue los mismos procedimientos que aquellos para preparar anticuerpos policlonales. De manera breve, un anticuerpo policlonal se prepara por medio de la inmunización de un animal con una composición inmunogénica de acuerdo y la recolección de antisueros de ese animal inmunizado. Una amplia gama de especies animales se puede utilizar para la producción de antisueros. De manera típica el animal utilizado para la producción de antisuero es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, un conejillo de indias o una cabra. Debido al volumen relativamente grande de sangre de los conejos, los conejos son por lo general preferidos para la producción de anticuerpos policlonales.

Las composiciones inmunogénicas a menudo varían en la inmunogenicidad. Por lo tanto, a menudo es necesario reforzar el sistema inmune del huésped, de acuerdo con lo que se puede lograr por medio del acoplamiento de un inmunógeno de péptido o polipéptido a un portador. Los portadores de ejemplo y preferidos son la hemocianina de lapa californiana (KLH, por su sigla en inglés) y la albúmina de suero bovino (BSA, por su sigla en inglés). Otras albúminas tales como ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo también se pueden utilizar como portadores. Los medios reconocidos para conjugar un polipéptido a una proteína portadora son muy conocidos e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimidas y bencidina bis-diazotizada.

La inmunogenicidad de una composición de inmunógeno particular se puede mejorar por el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmune, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes de ejemplo y preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerta), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La cantidad de composición de inmunógeno utilizada en la producción de anticuerpos policlonales varía dependiendo de la naturaleza del inmunógeno así como también el animal utilizado para la inmunización. Una variedad de vías se puede utilizar para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales se puede monitorizar por medio del muestreo de sangre del animal inmunizado en varios puntos después de la inmunización. También se puede administrar una segunda inyección de refuerzo. El proceso de reforzar y titular se repite hasta que se alcanza un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, el animal inmunizado se puede desangrar y aislar el suero, almacenarlo y cosechar el bazo para el aislamiento de ARNm de la respuesta policlonal o el animal se puede utilizar para generar MAb para el aislamiento de ARNm de una población de anticuerpos homogéneos.

Los MAb se pueden preparar con facilidad a través del uso de técnicas muy conocidas, tales como las ejemplificadas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.196.265, que se incorpora como referencia en la presente memoria. De manera típica, esta técnica implica la inmunización de un animal adecuado con una composición de inmunógeno seleccionada, por ej., un hapteno de molécula pequeña conjugado a un portador, una proteína, polipéptido o péptido purificada o parcialmente purificada. La composición de inmunización se administra de una manera efectiva para estimular las células productoras de anticuerpos. Los roedores tales como ratones y ratas son animales utilizados con frecuencia; sin embargo, también es posible el uso de células de conejo, ovejas o ranas. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas (Goding, págs. 60 y 61, 1986), pero se prefieren los ratones, en particular el ratón BALB/c, dado que se utiliza de manera más rutinaria y por lo general da un porcentaje más alto de fusiones estables.

Después de la inmunización, las células somáticas con el potencial para producir anticuerpos, de manera específica

linfocitos B (células B), se seleccionan para su uso en el protocolo de generación de MAb. Estas células se pueden obtener a partir de bazo biopsiados, amígdalas o nódulos linfáticos, o de muestras de sangre. Las células de bazo y las células sanguíneas son preferibles, las primeras porque son una fuente rica de células productoras de anticuerpos que están en la etapa de división de plasmablasto, y la segunda porque la sangre es accesible con facilidad. A menudo, un panel de animales se habrá inmunizado y se extraerá el bazo de animal con el título de anticuerpos más alto y los linfocitos del bazo obtenidos por medio de la homogeneización del bazo con una jeringa. De manera típica, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente  $5 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  linfocitos.

Los linfocitos B productores de anticuerpos del animal inmunizado se fusionan entonces con células de una célula de mieloma inmortal, por lo general una de la misma especie que el animal que fue inmunizado. Las líneas celulares de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión de productores de hibridoma con preferencia son no productoras de anticuerpos, tienen alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que se vuelven incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solamente las células fusionadas deseadas (hibridomas).

Se puede utilizar cualquiera de un número de células de mieloma, como son conocidas por aquéllos con experiencia en la técnica (Goding, págs. 65 y 66, 1986; Campbell, 1984). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se puede utilizar P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, SP210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para las ratas, se puede utilizar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6 son todas útiles en relación con las fusiones celulares humanas.

Una célula de mieloma murino preferida es la línea celular de mieloma NS-1 (también denominada P3-NS-1-Ag4-1), que está con facilidad disponible en el Repositorio de Células Mutantes Genéticas Humanas de NIGMS por medio de la solicitud del número repositario de la línea celular GM3573. Otra línea celular de mieloma de ratón que se puede utilizar es la línea celular no productora de SP2/0 de mieloma murino de ratón resistente a 8-azaguanina.

Los métodos para la generación de híbridos de células de bazo o de ganglios linfáticos productores de anticuerpos y células de mieloma usualmente comprenden la mezcla de células somáticas con células de mieloma en una proporción 2:1, si bien la proporción puede variar desde aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, respectivamente, en la presencia de un agente o agentes (químico o eléctrico) que promueve la fusión de las membranas celulares. Los métodos de fusión por el uso del virus Sendai han sido descritos por Kohler y Milstein (1975; 1976), y los que utilizan polietilenglicol (PEG), tales como 37% (v/v) de PEG, por Gefter *et al.*, (1977). También es adecuado el uso de métodos de fusión inducidos eléctricamente (Goding págs. 71 a 74, 1986).

Los procedimientos de fusión usualmente producen híbridos viables a bajas frecuencias, de aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-8}$ . Sin embargo, esto no plantea un problema, dado que los híbridos fusionados viables se diferencian de las células parentales, no fusionadas (en particular las células de mieloma no fusionadas que normalmente continuarían dividiéndose de manera indefinida) por medio del cultivo en un medio selectivo. El medio selectivo por lo general es uno que contiene un agente que bloquea la síntesis de novo de nucleótidos en el medio de cultivo tisular. Los agentes de ejemplo y preferidos son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis de novo tanto de purinas como de pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea la síntesis de purina solamente. Cuando se utiliza aminopterina o metotrexato, el medio se suplementa con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se utiliza azaserina, el medio se suplementa con hipoxantina.

El medio de selección preferido es HAT. Sólo las células capaces de operar vías de rescate de nucleótidos son capaces de sobrevivir en un medio HAT. Las células de mieloma son defectuosas en enzimas clave de la vía de rescate, por ej., la hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT, por su sigla en inglés), y no pueden sobrevivir. Las células B pueden operar esta vía, pero tienen una vida limitada en cultivo y por lo general mueren dentro de aproximadamente dos semanas. Por lo tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son aquellos híbridos formados a partir de células de mieloma y B.

Este cultivo proporciona una población de hibridomas a partir de la cual se seleccionan los hibridomas específicos. De manera típica, la selección de hibridomas se lleva a cabo por medio del cultivo de las células por la dilución de un solo clon en placas de microtitulación, seguido por pruebas de los sobrenadantes clonales individuales (después de aproximadamente dos a tres semanas) para la reactividad deseada. Los ensayos sencillos y rápidos incluyen radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, ensayos de citotoxicidad, ensayos de placa, ensayos de inmunounión de puntos, y similares.

Los hibridomas seleccionados se diluyen en serie y se clonan en líneas celulares individuales productoras de anticuerpos a partir de los cuales los clones entonces se pueden propagar de manera indefinida para proporcionar los MAb. Las líneas celulares se pueden explotar para la producción de MAb de dos maneras básicas. Se puede inyectar una muestra del hibridoma (a menudo en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se utilizó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido celular fusionado. Los fluidos



corporales del animal, tales como suero o fluido de ascitis, a continuación, se pueden tomar para proporcionar los MAb en una concentración elevada. Las líneas celulares individuales también se podrían cultivar *in vitro*, donde los MAb se secretan de forma natural en el medio de cultivo del que se pueden obtener con facilidad en altas concentraciones. Los MAb producidos por cualquiera de estos medios se pueden purificar de manera adicional, si se desea, por el uso de filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

Tras el aislamiento y la caracterización del anticuerpo monoclonal deseado, el ARNm se puede aislar por el uso de técnicas muy conocidas en la técnica y utilizarse como plantilla para la amplificación de la secuencia de destino.

Un número de procesos dependientes de plantilla están disponibles para amplificar las secuencias de destino antes y después de la mutagénesis. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada como PCR) que se describe en detalle en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis *et al.*, 1990, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad como referencia en la presente memoria. De manera breve, en la PCR, se preparan dos secuencias de cebadores que son complementarias a regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia de destino. Un exceso de desoxinucleósido trifosfatos se añade a una mezcla de reacción junto con una polimerasa de ADN, por ej., polimerasa de Taq. Si la secuencia de destino está presente en una muestra, los cebadores se unirán al destino y la polimerasa provocará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia de destino por medio de la adición sobre nucleótidos. Por medio de la elevación y la disminución de la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del objetivo para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al destino y a los productos de reacción y el proceso se repite. Con preferencia, se puede llevar a cabo un procedimiento de amplificación de PCR de transcriptasa inversa con el fin de cuantificar la cantidad de destino amplificado. Las metodologías de reacción en cadena de la polimerasa son muy conocidas en la técnica. Por el uso de técnicas de amplificación enzimáticas, tales como PCR, se pueden diseñar elementos de control deseados en el cebador y, por lo tanto, se pueden incorporar en el producto de ADN.

Otro método para la amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), que se revela en la EPA Núm. 320 308, que se incorpora en su totalidad como referencia en la presente memoria. En la LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias, y en presencia de la secuencia de destino, cada par se unirá a cadenas complementarias opuestas del objetivo de manera tal que hagan tope. En presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se enlazarán para formar una sola unidad. Por medio de ciclos de temperatura, al igual que en PCR, las unidades ligadas unidas se disocian del objetivo y entonces sirven como "secuencias de destino" para la ligación de los pares de sondas en exceso. La Patente de los Estados Unidos. Núm. 4.883.750 describe un método similar al LCR para la unión de pares de sondas a una secuencia de destino.

Qbeta Replicasa, descrita en la solicitud PCT Núm. PCT/US87/00880, también se puede utilizar como un método de amplificación. En este método, se añade una secuencia replicativa de ARN que tiene una región complementaria a la de un objetivo a una muestra en presencia de una ARN polimerasa. La polimerasa copiará la secuencia replicativa que luego se puede detectar.

Un método de amplificación isotérmico, en el que se utilizan endonucleasas de restricción y ligasas para conseguir la amplificación de moléculas de destino que contienen nucleótido 5'-[alfa-tio]-trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos (Walker *et al.*, 1992).

La amplificación por desplazamiento de Cadenas (SDA, por su sigla en inglés) es otro método para llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples rondas de desplazamiento de cadena y síntesis, es decir, traducción de cortes. Un método similar, denominado Reacción en Cadena de Reparación (RCR) implica el recocado de varias sondas a lo largo de una región de destino para la amplificación, seguido por una reacción de reparación en la que sólo están presentes dos de las cuatro bases. Las otras dos bases se pueden añadir como derivados biotinilados para una fácil detección. Un enfoque similar se utiliza en SDA. Las secuencias específicas de destino también se pueden detectar por el uso de una reacción de sonda cíclica (CPR, por su sigla en inglés). En CPR, una sonda que tiene secuencias 3' y 5' de ADN no específico y una secuencia media de ARN específico se hibrida a ADN que está presente en una muestra. Tras la hibridación, la reacción se trata con RNasa H, y los productos de la sonda identificados como productos distintivos que son liberados después de la digestión. La plantilla original se temple a otra sonda cíclica y se repite la reacción.

Otros métodos de amplificación se describen en la Solicitud de Gran Bretaña Núm. 2 202 328, y en la solicitud PCT Núm. PCT/US89/01025, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad como referencia en la presente memoria, y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. En la primera solicitud, los cebadores "modificados" se utilizan en una PCR como, síntesis dependiente de plantillas y enzimas. Los cebadores se pueden modificar por medio del etiquetado con un resto de captura (por ej., biotina) y/o un resto detector (por ej., enzima). En la última solicitud, se añade un exceso de sondas marcadas a una muestra. En presencia de la secuencia de destino, la sonda se une y se escinde de manera catalítica. Después de la escisión, la secuencia de destino se libera intacta para ser unida por la sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia

de destino.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS, por su sigla en inglés), que incluyen la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA, por su sigla en inglés) y 3SR (Kwoh *et al.*, 1989). En NASBA, los ácidos nucleicos se pueden preparar para la amplificación por medio de extracción estándar de fenol/cloroformo, la desnaturalización por calor de una muestra clínica, el tratamiento con tampón de lisis y columnas de minicentrifugación para el aislamiento de ADN y ARN o la extracción con cloruro de guanidinio de ARN. Estas técnicas de amplificación implican la hibridación de un cebador que tiene secuencias específicas de destino. Después de la polimerización, los híbridos de ADN/ARN son digeridos con RNasa H mientras que las moléculas de ADN de cadena doble se desnaturalizan con calor de nuevo. En cualquier caso, el ADN de cadena sencilla se hace completamente de cadena doble por medio de la adición de un segundo cebador específico de destino, seguido por la polimerización. Las moléculas de ADN de cadena doble luego se transcriben y se multiplican por una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN se transcriben de forma inversa en ADN de cadena doble, y se transcriben una vez contra con una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, ya sea truncados o completos, indican secuencias específicas de la de destino.

Davey *et al.*, la EPA Núm. 329 822 (que se incorpora en su totalidad como referencia en la presente memoria) revela un proceso de amplificación de ácido nucleico que implica la síntesis cíclica de ARN de cadena sencilla ("ARNmc"), ADNmc y ADN de cadena doble (ADNbc), que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. El ARNmc es un primera plantilla para un primer oligonucleótido cebador, que se alarga por medio de transcriptasa inversa (polimerasa de ADN dependiente de ARN). El ARN se retira a continuación del dúplex de ADN:ARN resultante por la acción de ribonucleasa H (RNasa H, una RNasa específica para ARN en dúplex con ADN o ARN). El ADNmc resultante es una segunda plantilla para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (ejemplificado por la ARN polimerasa T7) 5' a su homología con la plantilla. Este cebador se extiende entonces por ADN polimerasa (ejemplificada por el fragmento grande "Klenow" de polimerasa I de ADN de *E. coli*), que da como resultado una molécula de ADN de cadena doble ("ADNbc"), que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los cebadores y que de manera adicional tiene, en un extremo, una secuencia de promotor. Esta secuencia de promotor se puede utilizar por la ARN polimerasa apropiada para hacer muchas copias de ARN del ADN. Estas copias pueden volver a entrar en el ciclo que conduce a una amplificación muy rápida. Con la elección apropiada de enzimas, esta amplificación se puede hacer de manera isotérmica sin la adición de enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este proceso, la secuencia de inicio se puede elegir para estar en la forma de ADN o ARN.

Miller *et al.*, Solicitud PCT WO 89/06700 (que se incorpora en su totalidad como referencia en la presente memoria) revela un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia de promotor/cebador a una ADN de cadena sencilla ("ADNmc") de destino seguido por la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, las nuevas plantillas no se producen a partir de las transcripciones de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "carrera" y "PCR unilateral" (Frohman, 1990; O'Hara *et al.*, 1989).

También se pueden utilizar en la ventana de amplificación los métodos basados en la ligación de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácido nucleico que tiene la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, para amplificar de ese modo el di-oligonucleótido, (Wu *et al.*, 1989).

Los productos de amplificación se pueden analizar por medio de electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poli-acrilamida por el uso de métodos estándar (véase, por ej., Maniatis *et al.*, 1982). Por ejemplo, se puede utilizar un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizarse bajo luz UV. De manera alternativa, los productos de amplificación se pueden etiquetar de manera integral con nucleótidos etiquetados por radio o fluorometría. Los geles se pueden exponer luego a película de rayos x o visualizarse bajo los espectros de estimulación apropiados, respectivamente.

Los procedimientos mutagénicos de la presente invención pueden comprender cualquier enfoque mutagénico que se puede adaptar a un sitio particular en un gen, es decir, mutagénesis dirigida al sitio o específica del sitio. Debido a que la presente invención se basa en la mutagénesis amplia, la presente invención contempla como formas de realización preferidas aquellos procedimientos mutagénicos que son rápidos, eficientes y rentables.

En una forma de realización, el procedimiento mutagénico utiliza técnicas de síntesis química. De este modo, es posible colocar exactamente la sustitución en una o más localizaciones particulares dentro del gen, y también definir de manera específica la naturaleza de las alteraciones. Los métodos de síntesis química para el ADN son muy conocidos en la técnica. En este sentido, se prefieren las técnicas de fase sólida.

Una ventaja con el método de fase sólida de síntesis de genes es la oportunidad para la mutagénesis por el uso de técnicas de síntesis combinatoria. Las técnicas de síntesis combinatoria se definen como aquellas técnicas de producción de grandes colecciones o bibliotecas de compuestos de manera simultánea, por medio de la vinculación

secuencial de diferentes bloques de construcción. Las bibliotecas se pueden construir por el uso de compuestos libres en solución, pero con preferencia el compuesto está unido a un soporte sólido tal como una perla, una partícula sólida o incluso la presentación en la superficie de un microorganismo.

5 Existen varios métodos para la síntesis combinatoria (Holmes *et al.*, 1995; Burbaum *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1995; Freier *et al.*, 1995; Pei *et al.*, 1991; Bruce *et al.*, 1995; Ohlmeyer *et al.*, 1993), que incluyen la síntesis dividida o la síntesis paralela. La síntesis dividida se puede utilizar para producir pequeñas cantidades de un número relativamente grande de compuestos, mientras que la síntesis paralela producirá grandes cantidades de un número relativamente pequeño de compuestos. En términos generales, por el uso de la síntesis dividida, los compuestos se sintetizan en la superficie de una micropartícula. En cada paso, las partículas se dividen en varios grupos para la adición del siguiente componente. Los diferentes grupos se recombinan y se dividen para formar nuevos grupos. El proceso se repite hasta que se completa el compuesto. Cada partícula tiene varias copias del mismo compuesto que permite la separación y la purificación fácil. La síntesis dividida sólo se puede llevar a cabo por el uso de un soporte sólido.

15 Una técnica alternativa conocida como síntesis paralela se puede llevar a cabo ya sea en fase sólida o solución. Por el uso de síntesis paralela, los compuestos diferentes se sintetizan en recipientes separados, a menudo por el uso de la automatización. La síntesis paralela se puede llevar a cabo en una placa de microtitulación donde diferentes reactivos se pueden añadir a cada pocillo de una manera predefinida para producir una biblioteca combinatoria. La síntesis paralela es el enfoque preferido para su uso con técnicas enzimáticas. Se entiende bien que existen muchas modificaciones de esta técnica y se pueden adaptar para su uso con la presente invención. Por el uso de métodos combinatorios, se puede sintetizar un gran número de plantillas de genes mutantes.

También se pueden generar genes mutantes por métodos semisintéticos conocidos en la técnica (Barbas *et al.*, 1992). Por el uso de las regiones conservadas de un fragmento de anticuerpo como un marco, las regiones variables se pueden insertar en combinaciones aleatorias uno o más a la vez para alterar la especificidad del fragmento de anticuerpo y generar nuevos sitios de unión, en especial en la generación de anticuerpos a los antígenos no conducentes a la inmunización, tales como compuestos tóxicos o lábiles. En la misma línea, una secuencia de anticuerpo conocido se puede variar por la introducción de mutaciones aleatorias. Esto se puede lograr por métodos muy conocidos en la técnica tales como el uso de PCR propensa a errores.

30 Por el uso de los cebadores de oligonucleótidos apropiados, se utiliza la PCR para la rápida síntesis de la plantilla de ADN que contiene una o más mutaciones en el gen de la proteína de unión. La mutagénesis específica del sitio es una técnica útil en la preparación de péptidos individuales, o proteínas o péptidos biológicamente funcionales equivalentes, a través de mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica además proporciona una capacidad lista para preparar y variantes de secuencia de prueba, que incorporan de una o más de las consideraciones anteriores, por medio de la introducción de uno o más cambios de secuencias de nucleótidos en el ADN. La mutagénesis específica del sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como también un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de supresión que se atraviesa. De manera típica, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente de 5 a 10 residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que está siendo alterada.

40 La técnica de manera típica emplea un vector bacteriófago que existe tanto en una forma de cadena sencilla y doble. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida incluyen vectores tales como el fago M13. Estos vectores fagos están disponibles comercialmente y su uso por lo general es muy conocido por aquéllos con experiencia en la técnica. Los plásmidos de cadena doble también se emplean de manera rutinaria en la mutagénesis dirigida al sitio, lo que elimina el paso de transferir el gen de interés desde un fago a un plásmido.

45 En general, la mutagénesis dirigida al sitio se lleva a cabo primero por medio de obtención de un vector de cadena simple, o la fusión de dos cadenas de un vector de cadena doble que incluye en su secuencia una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada. Un cebador de oligonucleótido que lleva la secuencia mutada deseada se prepara de manera sintética. Este cebador se hibrida con la preparación de ADN de cadena sencilla, teniendo en cuenta el grado de falta de coincidencia cuando se seleccionan las condiciones de hibridación, y se somete a enzimas de polimerización de ADN tales como el fragmento de Klenow de *E. coli* polimerasa I, con el fin de completar la síntesis de la cadena que porta la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena lleva la mutación deseada. Este vector heterodúplex se utiliza a continuación para transformar células apropiadas, tales como células de *E. coli* y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que llevan la disposición de secuencia mutada.

55 La preparación de variantes de secuencia del gen seleccionado por el uso de mutagénesis dirigida al sitio se proporciona como un medio para la producción de especies potencialmente útiles y no pretende ser limitante, dado que hay otras maneras en las cuales se pueden obtener variantes de secuencia de los genes. Por ejemplo, los vectores recombinantes que codifican el gen deseado se pueden tratar con agentes mutagénicos, tales como

hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

En ciertas aplicaciones, la sustitución de aminoácidos por mutagénesis dirigida al sitio, se aprecia que se requieren condiciones de rigurosidad inferiores. En estas condiciones, la hibridación se puede producir a pesar de que las secuencias de sonda y cadena de destino no son perfectamente complementarias, pero no coinciden en una o más posiciones. Las condiciones se pueden volver menos rigurosas por medio del incremento de la concentración de sal y la disminución de la temperatura. Por ejemplo, una condición de rigurosidad media se podría proporcionar en aproximadamente 0,1 a 0,25 M de NaCl a temperaturas de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C, mientras que una condición de baja rigurosidad se podría proporcionar por aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M de sal, a temperaturas que varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. Por lo tanto, las condiciones de hibridación se pueden manipular con facilidad, y por lo tanto por lo general será un método de elección dependiendo de los resultados deseados.

En otras formas de realización, la hibridación se puede lograr en condiciones de, por ejemplo, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de ditiotreitól, a temperaturas entre aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C. Otras condiciones de hibridación utilizadas podrían incluir aproximadamente 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, a temperaturas que van desde aproximadamente 40 °C a aproximadamente 72 °C. También se puede utilizar formamida y SDS para alterar las condiciones de hibridación.

En una forma de realización particular, se puede emplear la superposición de PCR. En resumen, se utiliza un plásmido como una plantilla para la primera ronda de PCR. Los productos de PCR de la primera ronda se purifican y se utilizan, junto con los cebadores externos, en la reacción de PCR de extensión por solapamiento. Los productos finales contienen la sustitución dirigida al sitio de un aminoácido dado con todos los otros residuos de aminoácidos posibles.

La plantilla de ADN mutagenizado para el polipéptido de interés se puede clonar en un plásmido para la transcripción/traducción *in vitro* o en la forma de realización preferida, los elementos de control adecuados se incluyen dentro del producto de PCR para la transcripción/traducción *in vitro* directo. La transcripción/traducción *in vitro* de genes utiliza extractos libres de células para proporcionar las enzimas necesarias, ribosomas y factores de proteínas. La síntesis de proteínas es dirigida por ARNm sintetizados a partir de las plantillas de ADN deseadas. La plantilla de ADN debe contener los elementos de control apropiados para el sistema utilizado que incluyen un sitio de unión al ribosoma y la secuencia de promotor. Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán claramente los elementos requeridos adecuados para cada sistema.

Las técnicas procariotas *in vitro* para la producción de proteínas fueron las primeras en ser utilizadas (Zubay *et al.*, 1970). Posteriormente, se desarrollaron sistemas eucariotas por el uso de germen de trigo (Roberts, 1973) y reticulocitos de conejo (Pelham, 1976). Varios de los nuevos desarrollos han incrementado la eficacia de estas técnicas. Los ejemplos incluyen el desarrollo de cepas deficientes de nucleasa de *E. coli* para mejorar los resultados por el uso de plantillas de ADN lineal (Yang, 1980) y el tratamiento de lisados de reticulocitos con nucleasa microcócica para disminuir cualquier expresión de fondo del sistema.

Los sistemas más recientes desarrollados para la transcripción/traducción *in vitro* se basan en la transcripción por ARN polimerasas de fago que incluyen SP6 y SP7 (Krieg, 1987, Studier, 1990). El ADN colocado bajo el control de elementos del promotor T7 se puede utilizar como una plantilla para la transcripción *in vitro* por la ARN polimerasa de T7 o para la transcripción/traducción *in vitro* completa con la polimerasa añadida a cualquiera de un sistema de síntesis de proteínas procariotas o eucariotas. Si bien los métodos de la presente invención se pueden utilizar con cualquier sistema de transcripción/traducción *in vitro*, se prefiere el sistema T7 para la transcripción y se prefiere el uso de un sistema de traducción procariota como no se requiere nivelación del ARN.

Por el uso de métodos *in vitro* para la traducción, se pueden incorporar derivados de aminoácidos en la proteína por medio de la adición del aminoácido derivatizado a la mezcla del sistema de síntesis de proteínas. La variación de la concentración de los derivados, con respecto al aminoácido normal, le permite a uno para crear una población mixta y medir los efectos relativos a la caracterización de G.

Los polipéptidos mutantes generados por la presente invención se pueden caracterizar por el uso de una variedad de técnicas. En general, los productos de proteína se pueden analizar para el peso molecular aparente correcto por el uso de SDS-PAGE. Esto proporciona una indicación inicial de que el polipéptido fue, de hecho, sintetizado. Cuando se compara con la molécula natural, también indica si el plegado o el procesamiento normal están teniendo lugar con el mutante. En este sentido, puede resultar útil etiquetar el polipéptido. De manera alternativa, el polipéptido se puede identificar por medio de la tinción del gel.

Más allá de la mera síntesis, las proteínas se pueden caracterizar de acuerdo con diversas propiedades y una extensa gama de funciones. Las propiedades incluyen el punto isoeléctrico, la estabilidad térmica, la velocidad de sedimentación y el plegado. Una manera de examinar el plegado es la capacidad de ser reconocido por una

molécula de fijación análoga. El ejemplo principal de esta función es la interacción anticuerpo-antígeno. Una amplia variedad de diferentes formatos de inmunoensayo están disponibles para este propósito y son muy conocidos en la técnica. Principalmente, los cambios en cualquiera de afinidad o especificidad se pueden determinar cuando la proteína se pone en contacto con un ligando o paneles de ligandos relacionados específicos.

5 Los inmunoensayos se pueden dividir por lo general en dos tipos: los ensayos heterogéneos requieren múltiples pasos de separación, y los ensayos homogéneos que se llevan a cabo directamente. Los inmunoensayos heterogéneos en general implican un ligando o anticuerpo inmovilizado sobre una matriz sólida. Una muestra que contiene un ligando se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado y la cantidad de complejo formado en el soporte de la matriz se determina a partir de una etiqueta unida directamente o indirectamente al complejo inmovilizado. De acuerdo con lo utilizado en el contexto de la presente invención, el ligando se define como una especie que interactúa con una molécula no idéntica para formar un complejo fuertemente unido y estable. Para fines prácticos, la afinidad de unión por lo general es mayor que aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$  y está con preferencia en el intervalo de  $10^9$  a  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ . El ligando puede ser cualquiera de varios tipos de moléculas orgánicas, incluidos los hidrocarburos alicíclicos, los aromáticos polinucleares, los compuestos halogenados, los benzenoides, los hidrocarburos polinucleares, los heterocíclicos de nitrógeno, los heterocíclicos de azufre, los heterociclos de oxígeno, y los hidrocarburos de alcano, alqueno, alquino, etc. Las moléculas biológicas son de particular interés, que incluyen aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, sacáridos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Por supuesto, se entenderá que estos son solamente a modo de ejemplo y que los métodos de inmunoensayo contemplados son aplicables a la detección de una gama extraordinariamente amplia de compuestos, con la condición de que se pueda obtener un anticuerpo que se une con el ligando de interés.

Los inmunoensayos heterogéneos se pueden llevar a cabo como ensayos de tipo sándwich en los que se hace reaccionar una molécula de interés con un anticuerpo inmovilizado que une de manera específica esa molécula con alta afinidad. En un segundo paso, un conjugado formado a partir del mismo o diferente anticuerpo al antígeno y una molécula de marcador se hacen reaccionar con el complejo antígeno-anticuerpo en la matriz de inmovilización. Después de la eliminación del exceso de conjugado de marcador libre, se mide el conjugado de marcador unido, que es proporcional a la cantidad de ligando en la muestra.

La detección de la formación de inmunocomplejos es muy conocida en la técnica y se puede conseguir a través de la aplicación de numerosos enfoques. Estos enfoques se basan de manera típica en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquiera de las etiquetas o marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, electroquimioluminiscentes, biológicas o enzimáticas radioactivos conocidos en la técnica. Las Patentes de los Estados Unidos concernientes al uso de tales etiquetas incluyen las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241, cada una se incorpora como referencia en la presente memoria. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina, de acuerdo con lo conocido en la técnica.

Los métodos preferidos para la detección incluyen radioinmunoensayo (RIA, por su sigla en inglés) o el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por su sigla en inglés), siendo ELISA el más preferido debido al incremento de la sensibilidad general. Los ELISA se utilizan ampliamente en aplicaciones de biotecnología, en particular en inmunoensayos para una amplia gama de sustancias antigénicas. La sensibilidad del ELISA se basa en la amplificación enzimática de la señal.

Otras proteínas preferidas contempladas para su uso de acuerdo con la presente invención son aquellos que tienen un ensayo conveniente para la actividad. Los ejemplos representativos de las interacciones de destino incluyen la catálisis, las interacciones enzima-sustrato, las interacciones proteína-ácido nucleico, las interacciones receptor-ligando y las interacciones proteína-metal. En estos ensayos las proteínas mutantes se pueden comparar con la proteína de tipo salvaje para los cambios en la capacidad de llevar a cabo cualquiera de las funciones anteriores.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "poner en contacto" se define como llevar los componentes de reacción en proximidad suficientemente cerca uno del otro para permitir que se produzca la interacción deseada. El contacto se puede llevar a cabo por medio de la mezcla de los componentes en solución, por ejemplo, o por medio de la interacción heterogénea tal como por medio del contacto de flujo a través de una columna o matriz de inmovilización que se une a uno de los componentes.

Para las proteínas mutantes que tienen una actividad catalítica, la reacción apropiada se puede monitorear por un cambio en la velocidad catalítica o una alteración en la especificidad.

Los anticuerpos producidos y aislados por el método de la invención se seleccionan para unirse a un objetivo predeterminado. De manera típica, el objetivo predeterminado se selecciona en vista de su aplicabilidad como un objetivo de diagnóstico y/o terapéutico. El objetivo predeterminado puede ser un epítipo conocido o desconocido. Los anticuerpos por lo general se unen a un antígeno predeterminado (por ej., el inmunógeno) con una afinidad de aproximadamente por lo menos  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , con preferencia con una afinidad de aproximadamente por lo menos  $5 \times$

10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>, con mayor preferencia con una afinidad de por lo menos 1 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> a 1 x 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> o más, algunas veces hasta 1 x 10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup> o más. Con frecuencia, el antígeno predeterminado es una proteína humana, tal como, por ejemplo, un antígeno de superficie celular humana (por ej., CD4, CD8, receptor de IL-2, receptor de EGF, receptor de PDGF), otra macromolécula biológica humana (por ej., trombomodulina, proteína C, antígeno de carbohidrato, antígeno sialyl Lewis, L-selectina), o una macromolécula asociada a enfermedad no humana (por ej., LPS bacteriano, proteína de cápsida de virión o glicoproteína de envoltura) y similares.

En otro ejemplo, se han publicado varios informes de la utilidad de diagnóstico y terapéutica de scFv (Gruber *et al.*, 1994 *op. cit.*; Lilley *et al.*, 1994 *op. cit.*; Huston *et al.*, *Int. Rev. Immunol.* 1993, 10: a 195, Sandhu JS, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1992, 12: 437).

Los anticuerpos de cadena sencilla de alta afinidad de la especificidad deseada se pueden modificar por medio de manipulación genética y expresarse en una variedad de sistemas. Por ejemplo, se han producido scFv en plantas (Firek *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23: 861) y se pueden hacer con facilidad en sistemas procarióticos (Owens RJ y Young RJ, *J. Immunol. Meth.*, 1994, 168: 149; Johnson S y Bird RE, *Methods Enzymol.*, 1991, 203: 88). Además, los anticuerpos de cadena sencilla se pueden utilizar como base para la construcción de anticuerpos enteros o diversos fragmentos de las mismas (Kettleborough *et al.*, *Euro J. Immunol.*, 1994, 24: 952). La secuencia que codifica la región variable se puede aislar (por ej., por medio de amplificación por PCR o subclonación) y empalmarse a una secuencia que codifica una región constante humana deseada para codificar un anticuerpo de secuencia humana más adecuado para usos terapéuticos en seres humanos donde con preferencia se minimiza la inmunogenicidad. Los polinucleótidos que tienen las secuencias de codificación totalmente humanas resultantes se pueden expresar en una célula huésped (por ej., a partir de un vector de expresión en una célula de mamífero) y purificarse para una formulación farmacéutica.

Los constructos de expresión de ADN de manera típica incluirán una secuencia de ADN de control de expresión unido de manera operativa a las secuencias de codificación, que incluyen regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Con preferencia, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la colección y purificación de los mutantes anticuerpos "manipulados".

De acuerdo con lo declarado con anterioridad, las secuencias de ADN se expresarán en huéspedes después de que las secuencias se hayan unido de forma operativa a una secuencia de control de la expresión (es decir, posicionadas para asegurar la transcripción y la traducción del gen estructural). Estos vectores de expresión de manera típica son replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ej., tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.704.362, que se incorpora como referencia en la presente memoria).

Además de los microorganismos eucariotas tales como levaduras, también se puede utilizar un cultivo de células de tejidos de mamíferos para producir los polipéptidos de la presente invención (véase, Winnacker, "*From Genes to Clones*," VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987), que se incorpora como referencia en la presente memoria). Se prefieren las células eucariotas, debido a que se ha desarrollado en la técnica un número de líneas celulares huéspedes adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, e incluyen las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células B transformadas o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 1986, 89: 49), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, y similares.

La transcripción del ADN eucariótico se puede incrementar por medio de la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son secuencias que actúan en cis de entre 10 a 30 obp que incrementan la transcripción de un promotor. Los potenciadores pueden incrementar de manera eficaz la transcripción cuando ya sea 5' o 3' a la unidad de transcripción. También son eficaces si se encuentran dentro de un intrón o dentro de la propia secuencia de codificación. De manera típica, se utilizan potenciadores virales, que incluyen los potenciadores de SV40, los potenciadores de citomegalovirus, los potenciadores de polioma, y los potenciadores de adenovirus. Las secuencias potenciadoras de los sistemas de mamíferos también se utilizan comúnmente, tales como el potenciador de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón.

Los sistemas de vectores de expresión de mamíferos también incluyen de manera típica un gen marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de la timidina quinasa (TK), o genes procarióticos que confieren resistencia a los medicamentos. Los dos primeros

genes marcadores prefieren el uso de líneas celulares mutantes que carecen de la capacidad de crecer sin la adición de timidina al medio de crecimiento. Las células transformadas pueden entonces ser identificadas por su capacidad para crecer en medios no suplementados. Los ejemplos de genes de resistencia a fármacos procariotas útiles como marcadores incluyen genes que confieren resistencia a G418, ácido micofenólico e higromicina.

5 Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir en la célula huésped por métodos muy conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que se pueden utilizar el tratamiento con fosfato de calcio, la lipofección, o la electroporación para otros huéspedes celulares. Otros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, la fusión de protoplastos, los liposomas, la electroporación, y la microinyección (véase, por lo general, Sambrook *et al.*, *supra*).

15 Una vez expresados, los anticuerpos, las cadenas de inmunoglobulinas mutadas individuales, los fragmentos de anticuerpos mutados, y otros polipéptidos de inmunoglobulina de la invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, que incluyen la precipitación con sulfato de amonio, la cromatografía en columna de fracción, la electroforesis en gel y similares (véase, por lo general, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)). Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad de acuerdo con lo deseado, los polipéptidos se pueden entonces utilizar de manera terapéutica o en el desarrollo y la realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes, y similares (véase, por lo general, *Immunological Methods*, Vols. I y II, Eds. Lefkovits y Pernis, Academic Press, N. Y. N. Y. (1979 y 1981)).

20 Los oligopéptidos de la presente invención se pueden utilizar para el diagnóstico y la terapia. A modo de ilustración y no de limitación, los anticuerpos se pueden utilizar para tratar el cáncer, las enfermedades autoinmunes o infecciones virales. Para el tratamiento de cáncer, los anticuerpos de manera típica se unen a un antígeno expresado con preferencia en las células cancerosas, tales como erbB-2, CEA, CD33, y muchos otros antígenos muy conocidos por aquéllos con experiencia en la técnica. Para el tratamiento de la enfermedad autoinmune, los anticuerpos de manera típica se unen a un antígeno expresado en las células T, tales como CD4, el receptor de IL-2, los diversos receptores de antígenos de células T y muchos otros antígenos muy conocidos para aquéllos con experiencia en la técnica (por ej., véase *Fundamental Immunology*, 2da ed, W. E. Paul, ed., Raven Press: New York, N. Y., que se incorpora como referencia en la presente memoria). Para el tratamiento de infecciones virales, los anticuerpos de manera típica se unen a un antígeno expresado en células infectadas por un virus en particular, tales como las diversas glicoproteínas (por ej., gB, gD, gE) del virus herpes simplex y de citomegalovirus, y muchos otros antígenos muy conocidos aquéllos con experiencia en la técnica (por ej., véase *Virology*, 2da ed, B. N. Fields *et al.*, eds, (1990), Raven Press: Nueva York, N. Y.).

35 Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la presente invención son útiles para la administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Las composiciones para la administración parenteral comprenderán comúnmente una solución del anticuerpo o un cóctel del mismo disuelto en un portador aceptable, con preferencia un portador acuoso. Se puede utilizar una variedad de portadores acuosos, por ej., agua, agua tamponada, 0,4% de solución salina, 0,3% de glicina y similares. Estas soluciones son estériles y por lo general libres de materia particulada. Estas composiciones se pueden esterilizar por medio de técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares aceptables para uso farmacéutico de acuerdo con lo requerido para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como ajuste del pH y agentes tamponantes, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de los anticuerpos mutantes en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,01%, por lo general por lo menos aproximadamente 0,1% a tanto como 5% en peso y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluidos, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

45 De este modo, una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular se podría preparar para contener 1 ml de agua tamponada estéril, y aproximadamente 1 mg de anticuerpo mutante. Una composición típica para infusión intravenosa se puede prepara para contener 250 ml de solución de Ringer estéril, y 10 mg de anticuerpo mutante. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para aquéllos con experiencia en la técnica y se describen en más detalle en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science*, 20ma Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (2000).

55 Los biosimilares son agentes terapéuticos basados en proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica (es decir, una composición química) como un fármaco ético aprobado que ya no está protegido por patente. En un aspecto, las técnicas de la revelación se utilizan para biosimilares. Si bien es esencial para producir la proteína terapéutica en una formulación y composición equivalente, para ser competitivos en el mercado el biosimilar se debe hacer de forma rápida y lo más barato posible. Los medios de cultivo celular y el desarrollo de procesos son algunas de las partes más costosas y que requieren mucho tiempo de preparación y producción de un biosimilar.

El cambio de los codones mutación silenciosa dentro de una terapéutica de proteína cambia el codón utilizado para la traducción de proteínas pero conserva la secuencia de aminoácidos dentro de la proteína. Estos cambios de

codón en una variedad de posiciones dentro de una molécula, en particular en el extremo amino pueden tener un impacto significativo en la expresión y en algunos casos incluso la glicosilación. En un aspecto, las técnicas de la revelación se utilizan en la evolución, la selección y la preparación de los biosimilares.

5 Los siguientes ejemplos deben ser considerados ilustrativos y por lo tanto no son limitantes del resto de la revelación en modo alguno.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1A. Reacciones de Evolución de Inserción Posicional Comprensiva (CPI), Evolución de Supresión Posicional Comprensiva (CPD), Evolución Posicional comprensiva (CPE)**

Reacción de mutagénesis

10 Un par de cebadores (Mezcla de cebador 1 y Mezcla de cebador 2) se diseña para cada codón a mutar. El diseño dependerá de la secuencia de genes, y el análisis de secuencia de bases de datos tales como Sequencher (Gene Codes Corporation) o VectorNTI® (Life Technologies) se pueden utilizar para diseñar los cebadores. Para la Evolución de Supresión Posicional Comprensiva, un codón de destino degenerado (NNK o NNN) se diseña en el medio, flanqueado por 20 bases en cada lado (longitud total de imprimación: 40 bases, 96 clones para la  
15 secuenciación para identificar mutantes únicos), diseñado para que coincida con la secuencia de destino. Para la CPE, se diseña un par de cebadores para cada codón a mutar. Las bases, 96 clones para la secuenciación para identificar mutantes únicos), se diseña para que coincida con la secuencia de destino. Para la CPE, un par de cebadores se diseña para cada codón a mutar. Un codón de destino degenerado (NNK o NNN) está en el medio, flanqueado por 20 bases en cada lado (longitud total de imprimación: 43 bases, 96 clones para la secuenciación  
20 para identificar mutantes únicas). El ADN plantilla es el ADN vector con los genes de destino.

Preparar las siguientes reacciones en placas de PCR de pared delgada de 96 pocillos o tubos de PCR de pared delgada de 0,2 ml en hielo:

Mezcla de cebador 1 (2,5 uM)	5 ul
Mezcla de cebador 2 (2,5 uM)	5 ul
10X de tampón de ADN polimerasa Pfu turbo	2,5 ul
Plantilla de ADN (5, 10, 25 ng)	x ul
dNTP	2 ul
Agua libre de nucleasa	QS a 24,5 ul
ADN polimerasa <i>Pfu</i> turbo (2,5 U/ul)	0,5 ul
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>25 µl</b>

1. Preparar una reacción de control negativo por una placa de 96 pocillos (reemplazar los cebadores con tampón de TE)
- 25 2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una centrífuga de mesa.
3. Ciclar las reacciones por el uso de los parámetros de ciclado que se esbozan a continuación:

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	30 segundos
2	18	95 °C	30 segundos
		55 °C	1 minuto
		68 °C	16 minutos



## ES 2 741 175 T3

### Análisis de Control de Calidad

1. Para QC las reacciones de amplificación, configurar las siguientes reacciones en placas de PCR de pared delgada de 96 pocillos o tubos de PCR de pared delgada de 0,2 ml:

Reacción de mutagénesis	5 µl
Agua	4 µl
Tampón de carga de muestra	1 µl
<hr/>	
Volumen	10 µl

5 2. Cargar 10 µl sobre un gel de agarosa TAE al 1% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar 1 kb más escalera de ADN como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.

### Digerir las Reacciones de Mutagénesis con las enzimas de restricción apropiadas para la clonación en el vector de ADN Ejemplo para la enzima de restricción DpnI

1. Añadir 0,5 µl de la enzima de restricción DpnI (10 U/µl) directamente a cada reacción.
2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una centrifuga de mesa.
- 10 3. Incubar a 37 °C en las máquinas de PCR durante 2 horas.
4. Transformar 6 mezclas de reacción de cada uno de la placa de 96 pocillos en células Supercompetentes Azules XLI. Almacenar el resto de las reacciones a -20 °C.
5. Enfriar previamente tubos de PCR de 0,2 ml en hielo. Calentar el medio SOC a 42 °C.
6. Descongelar las células Supercompetentes Azules XLI en hielo. Cuando se descongelan, mezclar suavemente y dividir en alícuotas 50 µl de células en cada uno de los tubos enfriados previamente.
- 15 7. Añadir 0,8 µl de b-mercaptoetanol a cada alícuota de células. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos.
8. Añadir 2 µl de la mezcla de reacción a una alícuota de células. Mover los tubos suavemente.
9. Incubar los tubos en bloques fríos durante 30 minutos.
- 20 10. Pulsar con calor los tubos en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos.
11. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos.
12. Añadir 100 µl de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37 °C durante 1 hora con agitación a 225 a 250 rpm.
13. Colocar la mezcla de transformación entera en placas de agar LB que contienen carbenicilina.
- 25 14. Incubar las placas a 37 °C hasta el día siguiente.
15. Contar las colonias en las placas y recolectar 12 colonias de cada reacción de transformación para miniprep. y secuenciación.

### Transformación a Gran Escala

- 30 1. Descongelar las células Supercompetentes Azules XLI en hielo. Descongelar 20 tubos de células competentes para 96 reacciones. Cuando se descongelan, añadir 4 µl de b-mercaptoetanol a cada tubo de 250 µl de células competentes. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos.
2. Enfriar previamente tubos de PCR de 0,2 ml en hielo. Calentar el medio SOC a 42 °C.

## ES 2 741 175 T3

3. Dividir en alícuotas 50 µl de células en cada uno de los tubos enfriados previamente.
4. Añadir 2 µl de la mezcla de reacción a una alícuota de células. Mover los tubos suavemente.
5. Incubar los tubos en bloques fríos durante 30 minutos.
6. Pulsar con calor los tubos en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos.
- 5 7. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos.,
8. Añadir 100 µl de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37 °C durante 1 hora con agitación a 225 a 250 rpm.
9. Colocar la mezcla de transformación entera en placas de agar LB que contienen carbenicilina.
10. Incubar las placas a 37 °C hasta el día siguiente.
- 10 11. Cultivar las células en bloques de 96 pocillos para miniprep.
12. Preparar ADN miniprep por el uso del kit QIAVac 96 siguiendo el protocolo del fabricante.

### **Ejemplo 1B: Cribado de Mejora de Afinidad de Anticuerpos**

#### Transfección

- Una semana antes de la transfección, transferir células 293F a una monocapa de cultivo en Medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero (D-MEM, por su sigla en inglés).
  - Un día antes de la transfección, colocar en placas 0,2 x 10<sup>5</sup> y 0,4 x 10<sup>5</sup> células en 100 µl de D-MEM suplementado con suero por muestra de transfección en formatos de 96 pocillos.
1. Para cada muestra de transfección, preparar complejos de ADN-Lipofectamina.
  2. Diluir 0,2 µg de ADN en 50 µl de Medio con Suero Reducido Opti-MEM. Mezclar suavemente.
  - 20 3. Diluir 0,125 µl de lipofectamina en 50 µl de Medio con Suero Reducido Opti-MEM. Mezclar suavemente e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
  4. Combinar el ADN diluido con la Lipofectamina diluida. Mezclar suavemente e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
  5. Añadir los 100 µl de complejos de ADN-Lipofectamina a cada pocillo que contiene células y medio. Mezclar suavemente por medio del balanceo de la placa de un lado a otro.
  - 25 6. Incubar las células a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5%.
  7. Añadir 100 µl de D-MEM suplementado con suero a cada pocillo después de 6 horas. Incubar las células a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% hasta el día siguiente.
  - 30 8. Aspirar el medio en cada pocillo. Lavar cada pocillo con 100 µl de 293 SFM II con 4 mM de L-glutamina. Añadir 100 µl de 293 SFM II con 4 mM de L-glutamina a cada pocillo.
  9. Recolectar el sobrenadante por medio de ELISA 96 horas después de la transfección.

#### ELISA Funcional

1. Recubrir placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 100 µl de 2 µg/ml de antígeno en solución de recubrimiento.
- 35 2. Cubrir las placas con selladores e incubarlas hasta el día siguiente a 4 °C.
3. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.

## ES 2 741 175 T3

4. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
6. Añadir 200 ul de solución de bloqueo. Agitar a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
- 5 8. Añadir duplicados de 100 ul/pocillo de anticuerpo de control (2 ug/ml) en una solución de bloqueo a las placas.
9. Añadir duplicados de 100 ul de sobrenadante de la transfección (SOP 5A) a las placas.
10. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
11. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
12. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
- 10 13. Repetir los pasos 11 y 12 3 veces.
14. Añadir 100 ul de una dilución 1:5000 del conjugado de anticuerpo de cabra anti-humano purificado por afinidad con HRP en una solución de bloqueo a cada pocillo.
15. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
16. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
- 15 17. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
18. Repetir los pasos 17 y 18 3 veces.
19. Añadir 100 ul de sustrato Sigma TMB a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y comprobar cada 2 a 5 minutos.
20. Añadir 100 ul de HCl 1N para detener la reacción.
- 20 21. Leer a 450 nm.

### ELISA de Cuantificación

1. Recubrir placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 100 de 1 de 10 g/ml de IgG de cabra anti-humana específica de Fc purificada por afinidad en solución de recubrimiento.
2. Cubrir las placas con selladores e incubarlas hasta el día siguiente a 4 °C.
- 25 3. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
4. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
6. Añadir 200 ul de solución de bloqueo. Agitar a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
- 30 8. Añadir duplicados de 100 ul/pocillo de concentración estandarizada de IgG sérica humana purificada en una solución de bloqueo a las placas.
9. Añadir duplicados de 100 ul de sobrenadante de la transfección (SOP 5A) a las placas.
10. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.

11. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
12. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
13. Repetir los pasos 11 y 12 3 veces.
14. Añadir 100 ul de una dilución 1:5000 del conjugado de anticuerpo de cabra anti-humano purificado por afinidad con HRP en una solución de bloqueo a cada pocillo.
15. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
16. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
17. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
18. Repetir los pasos 17 y 18 3 veces.
19. Añadir 100 ul de sustrato Sigma TMB a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y comprobar cada 2 a 5 minutos.
20. Añadir 100 ul de HCl 1N para detener la reacción.
21. Leer a 450 nm.

**Ejemplo 1D: Síntesis combinatoria de proteínas (CPS)**

15 Combinación de los 10 mutantes superiores de un solo punto por CPS

Con el fin de mejorar aún más la afinidad, los 10 mutantes superiores de un solo punto (5 en la cadena ligera, 5 en la cadena pesada) se pueden combinar en una biblioteca combinatoria, expresarse y cribarse.

Los mutantes superiores de un solo punto se pueden combinar por una serie de pasos de PCR/PCR de superposición de acuerdo con lo indicado a continuación. Cualquiera de los mutantes de un solo punto se puede utilizar como plantilla para las reacciones de PCR iniciales. En la presente ilustración, pBA1 es la plantilla para las reacciones de PCR iniciales, y los mutantes de un solo punto están en las CDR I, II y III.

Todos los cebadores de la PCR están diseñados para incorporar las mutaciones relevantes y que coincidan con la plantilla. El diseño dependerá de las bases de datos de genes y el análisis de secuencia tal como Sequencher (Gene Codes Corporation) o VectorNTI® (Life Technologies) se pueden utilizar para diseñar los cebadores.

25 1) Combinación de mutantes en las CDR 1 y CDR 3

a. Llevar a cabo las 14 reacciones de PCR para LC y HC: recocado a 55 °C, cebadores de acuerdo con lo mostrado en la siguiente tabla, plantilla pBA1

	Cadena Ligera			Cadena Ligera		
	Cebador directo	Cebador inverso	Producto de PCR	Cebador directo	Cebador inverso	Producto de PCR
1	FP1	L1_R1	299 bp	FP2	H1_R1	392 bp
2	FP1	L1_R2	299 bp	FP2	H1_R2	392 bp
3	FP1	L1_R3	299 bp	FP2	H1_R3	392 bp
4	FP1	L1_R4	299 bp	FP2	H1_R4	392 bp
5	L1_F1	L3_R1	228 bp	H1_F1	H3_R1	250 bp
6	L1_F2	L3_R1	228 bp	H1_F2	H3_R1	250 bp
7	L1_F3	L3_R1	228 bp	H1_F3	H3_R1	250 bp
8	L1_F4	L3_R1	228 bp	H1_F4	H3_R1	250 bp

(continuación)

	Cadena Ligera			Cadena Ligera		
	Cebador directo	Cebador inverso	Producto de PCR	Cebador directo	Cebador inverso	Producto de PCR
9	L1_F1	L3_R2	228 bp	H1_F1	H3_R2	250 bp
10	L1_F2	L3_R2	228 bp	H1_F2	H3_R2	250 bp
11	L1_F3	L3_R2	228 bp	H1_F3	H3_R2	250 bp
12	L1_F4	L3_R2	228 bp	H1_F4	H3_R2	250 bp
13	L3_F1	RP1	~ 1300 bp	H3_F1	RP1	290 bp
14	L3_F2	RP1	~ 1300 bp	H3_F2	RP1	290 bp

- b. Consultar las reacciones de PCR en gel de agarosa.
- 5 c. Reunir las reacciones 1 a 4, 5 a 12, y 13 a 14 para las cadenas pesadas y ligeras en una relación 1:1 y purificar por gel los productos de longitud completa (PCR L1, L2, L3, PCR H1, H2, H3)
- d. Combinar los productos de PCR L1, L2, L3 por medio de PCR de extensión por solapamiento por el uso de los productos purificados por gel procedentes del paso 1C y los cebadores FP1/RP1.
- e. Combinar los productos de PCR H1, H2, H3 por medio de PCR de extensión por solapamiento por el uso de los productos purificados por gel procedentes del paso 1C y los cebadores FP2/RP1.
- 10 f. Purificar por gel los productos de longitud completa de los pasos 1d y 1e (= PCR de solapamiento 1; LC: 1,6 kpb, HC: 855 bp)

2) Adición de los mutantes en CDR 2

	Cadena Ligera			Cadena Ligera		
	Cebador directo	Cebador inverso	Producto de PCR	Cebador directo	Cebador inverso	Producto de PCR
15	FP1	L2_R1	369 bp	FP2	H2_R1	487 bp
16	FP1	L2_R2	369 bp	FP2	H2_R2	487 bp
17	FP1	L2_R3	369 bp	FP2	H2_R3	487 bp
18	FP1	L2_R4	369 bp	FP2	H2_R4	487 bp
19	L2_F1	RP1	~ 1450bp	H1_F1	RP1	413 bp
20	L2_F2	RP1	~ 1450bp	H1_F2	RP1	413 bp
21	L2_F3	RP1	~ 1450bp	H1_F3	RP1	413 bp
22	L2_F4	RP1	~ 1450bp	H1_F4	RP1	413 bp

- 15 a. Llevar a cabo las reacciones de PCR de 15 a 22 para LC y HC: recocado a 55 °C, cebadores de acuerdo con lo mostrado en la siguiente tabla, producto de PCR de solapamiento purificado por gel de plantilla del paso 1f
- b. Comprobar la reacción de PCR en gel de agarosa.
- c. Reunir las reacciones de 15 a 18, de 19 a 22 para las cadenas pesadas y ligeras en una relación 1:1 y purificar por gel los productos de longitud completa (PCR L4, L5, PCR H4, H5)

- d. Combinar productos de PCR L4, L5 por medio de PCR de extensión por solapamiento por el uso de los productos purificados por gel procedentes del paso 2C y los cebadores FP1/RP1.
- e. Combinar productos de PCR H4, H5 por medio de PCR de extensión por solapamiento por el uso de los productos purificados por gel procedentes del paso 2C y los cebadores FP2/RP1 (LC: 861 bp).
- 5 f. Purificar por gel los productos de longitud completa de los pasos 2d y 2e (= PCR de solapamiento 2; LC: 1,6 kpb, HC: 855 bp).
- 3) Clonación de productos de longitud completa
- a. Cadenas pesadas
- 10 i. Cortar el producto de PCR de superposición de HC del paso 2f con RE1/RE2 y clonar en corte de plásmido purificado por gel y CIPed con RE1/RE2
- ii. Presentar 2 placas de 96 pocillos para la secuenciación
- iii. Identificar 32 combinaciones únicas de HC de acuerdo con las secuencias de referencia
- iv. Almacenar en glicerol las combinaciones de HC únicas y el ADN de plásmido miniprep
- 15 v. Reunir los ADN plasmídicos de HC a 1:1, cortarlos con RE3/RE4 y purificar por gel el inserto (~ 2,1 kpb) → reunir 7HC
- b. Cadenas ligeras
- i. Cortar el producto de PCR de superposición de LC del paso 2f con RE5/RE2 y clonar en corte de plásmido purificado por gel y CIPed con RE5/RE2
- ii. Presentar 2 placas de 96 pocillos para la secuenciación
- 20 iii. Identificar 32 combinaciones únicas de LC de acuerdo con las secuencias de referencia
- iv. Almacenar en glicerol las combinaciones de LC únicas y los ADN miniprep
- v. Cortar los ADNs de LC de manera individual con RE3/RE4, CIP y purificar por gel la banda del vector

4) Combinación de LC y HC

- a. Clonar la reunión de HC desde el paso 3a v. en cada LC única desde el paso 3b v.
- 25 b. Presentar 96 clones por LC para la secuenciación
- c. Identificar combinaciones de LC/HC únicas y disponer en placas de 96 pocillos
- d. Almacenar en glicerol y miniprep para la expresión

**Ejemplo 2. Evolución Posicional Comprensiva**

Este ejemplo describe el método de creación de cambios de nucleótidos específicos en un constructo de anticuerpo.

30 **Reacción de mutagénesis**

Preparar las siguientes reacciones en placas de PCR de pared delgada de 96 pocillos o tubos de PCR de pared delgada de 0,2 ml en hielo:

Mezcla de cebador 1 (2,5 µM)	5 µl
Mezcla de cebador 2 (2,5 µM)	5 µl

## ES 2 741 175 T3

10X de tampón de ADN polimerasa Pfu turbo	2,5 µl
Plantilla de ADN (5, 10, 25 ng)	x µl
dNTP	2 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 24,5 µl
ADN polimerasa <i>Pfu</i> turbo (2,5 U/µl)	0,5 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>25 µl</b>

1. Preparar una reacción de control negativo por una placa de 96 pocillos (reemplazar los cebadores con tampón de TE)
- 5 2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una centrífuga de mesa.
3. Ciclar las reacciones por el uso de los parámetros de ciclado que se esbozan a continuación:

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	30 segundos
2	18	95 °C	30 segundos
		55 °C	1 minuto
		68 °C	16 minutos

### Análisis de Control de Calidad

- 10 1. Para QC las reacciones de amplificación, configurar las siguientes reacciones en placas de PCR de pared delgada de 96 pocillos o tubos de PCR de pared delgada de 0,2 ml:

Reacción de mutagénesis	5 µl
Agua	4 µl
Tampón de carga de muestra	1 µl
<b>Volumen</b>	<b>10 µl</b>

2. Cargar 10 µl en un gel de agarosa TAE al 1% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar 1 kb más escalera de ADN como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.

### Digerir las Reacciones de Mutagénesis con *DpnI*

16. Añadir 0,5 µl de la enzima de restricción *DpnI* (10 U/µl) directamente a cada reacción.
- 15 17. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una centrífuga de mesa.
18. Incubar a 37 °C en las máquinas de PCR durante 2 horas.
19. Transformar 6 mezclas de reacción de cada uno de la placa de 96 pocillos en células Supercompetentes Azules XLI. Almacenar el resto de las reacciones a -20 °C.
20. Enfriar previamente tubos de PCR de 0,2 ml en hielo. Calentar el medio SOC a 42 °C

## ES 2 741 175 T3

21. Descongelar las células Supercompetentes Azules XLI en hielo. Cuando se descongelan, mezclar suavemente y dividir en alícuotas 50  $\mu$ l de células en cada uno de los tubos enfriados previamente.
22. Añadir 0,8  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol a cada alícuota de células. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos.
- 5 23. Añadir 2  $\mu$ l de la mezcla de reacción a una alícuota de células. Mover los tubos suavemente.
24. Incubar los tubos en bloques fríos durante 30 minutos.
25. Pulsar con calor los tubos en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos.
26. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos.
- 10 27. Añadir 100  $\mu$ l de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37 °C durante 1 hora con agitación a 225 a 250 rpm.
28. Colocar la mezcla de transformación entera en placas de agar LB que contienen carbenicilina.
29. Incubar las placas a 37 °C hasta el día siguiente.
30. Contar las colonias en las placas y recolectar 12 colonias de cada reacción de transformación para miniprep. y secuenciación.

### 15 **Transformación a Gran Escala**

13. Descongelar las células Supercompetentes Azules XLI en hielo. Descongelar 20 tubos de células competentes para 96 reacciones. Cuando se descongelan, añadir 4  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol a cada tubo de 250  $\mu$ l de células competentes. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos.
14. Enfriar previamente tubos de PCR de 0,2 ml en hielo. Calentar el medio SOC a 42 °C.
- 20 15. Dividir en alícuotas 50  $\mu$ l de células en cada uno de los tubos enfriados previamente.
16. Añadir 2  $\mu$ l de la mezcla de reacción a una alícuota de células. Mover los tubos suavemente.
17. Incubar los tubos en bloques fríos durante 30 minutos.
18. Pulsar con calor los tubos en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos.
19. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos.,
- 25 20. Añadir 100  $\mu$ l de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37 °C durante 1 hora con agitación a 225 a 250 rpm.
21. Colocar la mezcla de transformación entera en placas de agar LB que contienen carbenicilina.
22. Incubar las placas a 37 °C hasta el día siguiente.

### **Apéndice 1: Recetas de Tampón**

#### 30 50X tampón de TAE

- 242 g de base Tris
- 57,1 ml de ácido acético glacial
- 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro



## ES 2 741 175 T3

### 1X tampón de TAE

- 20 ml de 50X tampón de TAE
- 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

### 1% de Gel de Agarosa con bromuro de etidio

- 5 • 1 g de agarosa LE
- 100 ml de 1X tampón de TAE
- Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
- Enfriar la agarosa a 55 °C
- Añadir 2,5 µl de 20 mg/ml de Bromuro de Etidio a la agarosa
- 10 • Verter sobre una plataforma de gel

### LB

- 10 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 15 • Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5N
- Someter a autoclave

### Agar de LB-carbenicilina

- 10 g de NaCl
- 20 • 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 20 g de agar
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5N
- 25 • Someter a autoclave
- Enfriar a 55 °C
- Añadir 10 ml de 10 mg/ml de carbenicilina esterilizada por filtración
- Verter en placas de Petri (25 ml/placa de 100 mm)

### Medio SOC

- 30 • 0,5 g de NaCl
- 20 g de triptona

- 0,5 g de extracto de levadura
  - 2 ml de glucosa al 20% esterilizada por filtración
  - Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
  - Someter a autoclave
- 5 • Añadir 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M esterilizada por filtración y 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M esterilizada por filtración antes de su uso

### Ejemplo 3. ELISA Funcional

Este ejemplo describe el método de la comparación de la afinidad de los anticuerpos en el sobrenadante del cultivo celular.

- 10 1. Recubrir placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 100 µl de 2 mg/ml de antígeno en solución de recubrimiento.
2. Cubrir las placas con selladores e incubarlas hasta el día siguiente a 4 °C.
3. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
4. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
- 15 5. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
6. Añadir 200 ul de solución de bloqueo. Agitar a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
8. Añadir duplicados de 100 ul/pocillo de anticuerpo de control (2 µl/ml) en una solución de bloqueo a las placas.
9. Añadir duplicados de 100 ul de sobrenadante de la transfección a las placas.
- 20 10. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
11. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
12. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
13. Repetir los pasos 11 y 12 3 veces.
- 25 14. Añadir 100 ul de una dilución 1:5000 del conjugado de anticuerpo de cabra anti-humano purificado por afinidad con HRP en una solución de bloqueo a cada pocillo.
15. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
16. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
17. Añadir 200 ul de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
18. Repetir los pasos 17 y 18 3 veces.
- 30 19. Añadir 100 ul de sustrato Sigma TMB a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y comprobar cada 2 a 5 minutos.
20. Añadir 100 ul de HCl 1N para detener la reacción.
21. Leer a 450 nm.

**Apéndice 1: Recetas de Tampón**

Solución de lavado

- 0,05% de Tween-20 en PBS

Solución de bloqueo

- 5
- 2% de leche no grasa Carnation en PBS

**Ejemplo 4. Transfección de Células de CHO-S**

Este ejemplo describe el método de transfección de ADN en células de CHO-S.

1. Una semana antes de la transfección, transferir las células de CHO-S para cultivo en monocapa en Medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero (D-MEM).
- 10 2. Un día antes de la transfección, colocar en placas  $0,4 \times 10^5$  células en 100  $\mu\text{l}$  de D-MEM suplementado con suero por muestra de transfección en formatos de 96 pocillos.
3. Llevar a cabo la transfección al final de la jornada de trabajo.
4. Para cada muestra de transfección, preparar complejos de ADN-Lipofectamina.
5. Diluir 0,2  $\mu\text{g}$  de ADN en 25  $\mu\text{l}$  de Medio con Suero Reducido Opti-MEM. Mezclar suavemente.
- 15 6. Diluir 0,5  $\mu\text{l}$  de Lipofectamina en 25  $\mu\text{l}$  de Medio con Suero Reducido Opti-MEM. Mezclar suavemente e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Combinar el ADN diluido con la Lipofectamina diluida. Mezclar suavemente e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- 20 8. Añadir los 50  $\mu\text{l}$  de complejos de ADN-Lipofectamina a cada pocillo que contiene células y medio. Mezclar suavemente por medio del balanceo de la placa de un lado a otro.
9. Incubar las células a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% hasta el día siguiente.
10. Aspirar el medio en cada pocillo. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de D-MEM suplementado con suero a cada pocillo. Recolectar el sobrenadante para el ensayo de ELISA y el lisado de células para el ensayo de beta-galactosidasa.

**Apéndice 1: Recetas de Tampón**

25 Suero fetal bovino inactivado por calor

- 500 ml suero fetal bovino inactivado por calor en la botella original del vendedor
- Calentar durante 30 minutos a 56 °C con mezcla cada 5 minutos
- Preparar alícuotas de 50 ml y almacenar a -20 °C

Medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero

- 30
- 500 ml de Medio de Eagle modificado por Dulbecco
  - 50 ml de suero fetal bovino inactivado por calor
  - 5 ml de 10 mM Aminoácidos MEM No Esenciales

**Ejemplo 5. Síntesis en Fase Líquida de Dominio Variable de Combinatoria**

**Bibliotecas - Cadena Ligera**

5 Este ejemplo describe el montaje de una biblioteca de dominio variable humanizada de cadena ligera (LC). La biblioteca contiene marcos humanos de cadena ligera (FW) y regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDR) en el orden de: FW1 - CDR 1 - FW2 - CDR 2 - FW3 - CDR 3. Hay un total de 7 fragmentos FW1, 4 fragmentos FW2 y 8 fragmentos FW3. La biblioteca se monta por el uso de ligación de fase líquida paso a paso de fragmentos FW y de ADN CDR.

**Montaje del dominio variable de LC**

**Nota 1: Llevar a cabo la Ligación 1 y la Ligación 2 al mismo tiempo.**

**Nota 2: Llevar a cabo la Ligación 3 y la Ligación 4 al mismo tiempo.**

**Ligación 1: FW1b → FW1a**

10 1. Preparar las siguientes reacciones de ligación en tubos de microcentrífuga en hielo:

**Nota: Hay 7 reacciones de ligación (FW1-1 a FW1-7). Preparar cada reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga diferente, para un total de 7 tubos.**

Fragmentos FW1A (250 pmoles)	x µl
Fragmentos FW1b (250 pmoles)	x µl
10X Tampón de ligasa T4	2 µl
10 mM de rATP	1 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 19 µl
Ligasa T4	1 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>20 µl</b>

2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.

3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

15 4. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Ligaciones FW1	20 µl
10x de Tampón de carga de muestra	3 µl
<b>Volumen Total</b>	<b>23 µl</b>

5. Cargar en un gel de agarosa TAE al 4% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 25 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.

6. Recortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.

20 7. Combinar fragmentos de gel procedentes de las 7 reacciones de ligación en dos tubos de microcentrífuga.

8. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.

9. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

10. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.

25 11. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.

12. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
  13. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
  14. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
- 5
15. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
  16. Añadir 52 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.
  17. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 µl en gel de agarosa al 4% para QC los productos de ligación purificados.

10 **Ligación 2: FW3b → FW3a**

18. Preparar las siguientes reacciones de ligación en tubos de microcentrífuga en hielo:

**Nota: Hay 8 reacciones de ligación (FW3-1 a FW3-8). Preparar cada reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga diferente, para un total de 7 tubos.**

Fragmentos FW3a (250 pmoles)	x µl
Fragmentos FW3b (250 pmoles)	x µl
10X Tampón de ligasa T4	2 µl
10 mM de rATP	1 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 19 µl
Ligasa T4	1 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>20 µl</b>

19. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
- 15
20. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
  21. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

FW 3 ligaciones	20 µl
10x Tampón de carga de muestra	3 µl
<b>Volumen Total</b>	<b>23 µl</b>

22. Cargar en un gel de agarosa TAE al 4% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 25 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.
- 20
23. Recortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.
  24. Combinar fragmentos de gel procedentes de las 7 reacciones de ligación en dos tubos de microcentrífuga.
  25. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.
  26. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

27. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.
28. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.
29. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
30. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 5 31. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
32. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
33. Añadir 52 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.
- 10 34. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 µl en gel de agarosa al 4% para QC.

**Ligación 3: CDR 1 → FW1**

1. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga en hielo:

Fragmentos CDR 1 (1 nmol)	x µl
Fragmentos FW1 combinados purificados por gel	94 µl
10X Tampón de ligasa T4	14 µl
10 mM de rATP	1 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 139 µl
Ligasa T4	1 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>140 µl</b>

2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 15 4. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Ligaciones CDR 1-FW 1	140 µl
10x Tampón de carga de muestra	15 µl
<b>Volumen Total</b>	<b>155 µl</b>

5. Cargar en un gel de agarosa TAE al 4% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 25 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.
6. Recortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.
- 20 7. Combinar los fragmentos de gel en dos tubos de microcentrífuga.
8. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.
9. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

## ES 2 741 175 T3

10. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.
11. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.
12. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
13. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 5 14. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
15. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
16. Añadir 52 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.
- 10 17. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 µl en gel de agarosa al 4% para QC.

### Ligación 4: CDR 2 → FW3

18. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga en hielo:

Fragmentos CDR 2 (1 nmol)	x µl
Fragmentos FW3 combinados purificados por gel	94 µl
10X Tampón de ligasa T4	14 µl
10 mM de rATP	1 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 139 µl
Ligasa T4	1 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>140 µl</b>

19. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
20. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 15 21. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Ligaciones CDR 2-FW3	140 µl
10x Tampón de carga de muestra	15 µl
<b>Volumen Total</b>	<b>155 µl</b>

22. Cargar en un gel de agarosa TAE al 4% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 25 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.
23. Recortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.
- 20 24. Combinar los fragmentos de gel en dos tubos de microcentrífuga.
25. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.
26. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

27. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.
28. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.
29. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
30. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 5 31. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
32. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
33. Añadir 52 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.
- 10 34. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 µl en gel de agarosa al 4% para QC.

**Montaje de Dominio Variable de LC (cont.)**

**Nota: Llevar a cabo la Ligación 5 y la Ligación 6 al mismo tiempo.**

**Ligación 5: FW2 → CDR 1-FW1**

1. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga en hielo:

Reunión de fragmentos FW2 (450 pMoles)	x µl
Fragmentos CDR 1-FW1 combinados purificados por gel	94 µl
10X Tampón de ligasa T4	14 µl
10 mM de rATP	1 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 139 µl
Ligasa T4	1 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>140 µl</b>

**Nota: La reunión de fragmentos FW2 contiene 5 fragmentos FW2, cada uno a 90 pMoles**

- 15 2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Ligaciones FW2-CDR-1-FW1	140 µl
10x Tampón de carga de muestra	15 µl
<b>Volumen Total</b>	<b>155 µl</b>

5. Cargar en un gel de agarosa TAE al 4% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 25 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.
- 20 6. Recortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.
7. Combinar fragmentos de gel procedentes de las 7 reacciones de ligación en dos tubos de microcentrífuga.



8. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.
9. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.
10. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.
- 5 11. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.
12. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
13. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
14. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
- 10 15. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
16. Añadir 30 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.
17. Combinar el ADN eluido (volumen total de 60 µl) y cargar 3 en gel de agarosa al 4% para QC.

**Ligación 6: CDR 3 → FW3-CDR 2**

- 15 18. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga en hielo:

CDR 3 reunión de fragmentos (500 pMoles)	x µl
Fragmentos FW3-CDR 2 combinados purificados por gel	94 µl
10X Tampón de ligasa T4	14 µl
10 mM de rATP	1 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 139 µl
Ligasa T4	1 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>140 µl</b>

---

**Nota: La reunión de fragmentos FW2 contiene 4 fragmentos FW2, cada uno a 90 pMoles**

---

19. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
20. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
21. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Ligaciones CDR 3-FW3-CDR 2	140 µl
10x Tampón de carga de muestra	15 µl
<b>Volumen Total</b>	<b>155 µl</b>
- 20 22. Cargar en un gel de agarosa TAE al 4% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 25 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.
23. Recortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.

24. Combinar fragmentos de gel procedentes de las 7 reacciones de ligación en dos tubos de microcentrífuga.
25. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.
26. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.
- 5 27. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.
28. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.
29. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
30. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 10 31. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
32. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
33. Añadir 30 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.
34. Combinar el ADN eluido (volumen total de 60 µl) y cargar 3 µl en gel de agarosa al 4% para QC.

15 **Ligación 7: Dominio variable de LC de longitud completa**

1. Preparar las reacciones de ligación en un tubo de microcentrífuga en hielo:

Fragmentos FW1-CDR 1-FW2	49 µl
Fragmentos CDR 2-FW3-CDR 3	49 µl
10X Tampón de ligasa T4	12 µl
10 mM de rATP	5 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 345 µl
Ligasa T4	5 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>350 µl</b>

2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Ligaciones de dominio variable de LC de longitud completa	140 µl
10x Tampón de carga de muestra	15 µl
<b>Volumen Total</b>	<b>155 µl</b>

- 20 5. Cargar en un gel de agarosa TAE al 3% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 100 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.
6. Recortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.

7. Combinar fragmentos de gel en un tubo de microcentrifuga.
  8. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.
  9. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.
- 5
10. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.
  11. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.
  12. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
  13. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 10
14. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
  15. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrifuga de 1,5 ml.
  16. Añadir 30 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.
  17. Cargar 3 µl de gel de agarosa al 3% para QC.

15 Apéndice 1: Recetas de Tampón

50X tampón de TAE

- 242 g de base Tris
  - 57,1 ml de ácido acético glacial
  - 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O
- 20
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro

1X tampón de TAE

- 20 ml de 50X tampón de TAE
- 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

Gel de Agarosa al 3% con bromuro de etidio

- 25
- 3 g de agarosa LE
  - 100 ml de 1X tampón de TAE
  - Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
  - Enfriar la agarosa a 55 °C
  - Añadir 2,5 µl de 20 mg/ml de Bromuro de Etidio a la agarosa

- 30
- Verter sobre una plataforma de gel

Gel de agarosa al 4% con bromuro de etidio

- 4 g de agarosa LE

- 100 ml de 1X tampón de TAE
  - Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
  - Enfriar la agarosa a 55 °C
  - Añadir 2,5 µl de 20 mg/ml de Bromuro de Etidio a la agarosa
- 5 • Verter sobre una plataforma de gel

**Determinación de las CDR de Cadena Ligera**

El siguiente conjunto de reglas permite la identificación de las CDR en la mayoría de secuencias de dominio variable de cadena ligera de anticuerpo.

**CDR-L1**

- Comienzo: ~ posición 24, **siempre 1 después de un residuo de cisteína**
- Residuos antes: C
- Longitud: 10 a 17 aminoácidos
- Residuos después: **siempre una W**, por lo general W-Y-Q, sino también W-L-Q, W-F-Q, W-Y-L

10

**CDR-L2**

- Comienzo: **siempre** 16 residuos después del final de CDR-L1
- Residuos antes: por lo general I-Y, sino también V-Y, I-K, I-F
- Longitud: **siempre** 7 aminoácidos

**CDR-L3**

- Comienzo: **siempre** 33 residuos después del final de CDR-L2 (**siempre** 2 después de una cisteína)
- Residuos antes: **siempre C**
- Longitud: de 7 a 11 residuos
- Residuos después: F-G-X-G (de manera típica F-G-Q-G)

**Ejemplo 6. Ensayo de β-galactosidasa**

15 Este ejemplo describe el método para medir de manera cuantitativa los niveles de expresión de β-galactosidasae en células transfectadas por el uso de ONPG como sustrato.

1. Aspirar el medio de crecimiento de la placa de cultivo. Lavar 1 vez con PBS 1x.
2. Añadir 1x tampón de lisis a la placa de cultivo. Utilizar la siguiente guía de volumen de solución para diversas placas de cultivo:

Tipo de placa de cultivo	Volumen de 1x Tampón de Lisis (µl/pocillo)
placa de 96 pocillos	50
placa de 24 pocillos	250
placa de 12 pocillos	500

placa de 6 pocillos	1000
plato de 60 mm	2500
plato de 100 mm	5000

3. Incubar el plato 10 a 15 minutos a temperatura ambiente por medio de la agitación lenta varias veces para asegurar la lisis completa. Observar los platos de cultivo bajo un microscopio para confirmar que las células se lisan por completo.

5 **Nota: De manera alternativa, congelar las células durante por lo menos una hora a -20 °C y descongelarlas a temperatura ambiente.**

4. Preparar una dilución en serie de estándares de β-galactosidasa con Tampón de Dilución Estándar separado. Una alícuota de 50 µl de cada punto de la curva estándar se transfiere a los pocillos de control de la placa de ensayo. La cantidad más alta recomendada de β-galactosidasa es de 200 miliunidades (200.000 a 400.000 pg). Diluir los estándares de acuerdo con la indicación a continuación: Guía de Dilución Estándar de β-gal

Estándar de β-gal (miliunidades)	Volumen de Tampón de Dilución Estándar	Volumen Estándar de β-gal
200	990	10 µl de madre de estándar de b-gal
100	200	200 µl de 200 mu estándar de b-gal
50	200	200 µl de 100 mu estándar de b-gal
25	200	200 µl de 50 mu estándar de b-gal
12,5	200	200 µl de 25 mu estándar de b-gal
6,25	200	200 µl de 12,5 mu estándar de b-gal
3,125	200	200 µl de 6,25 mu estándar de b-gal
1,562	200	200 µl de 3,125 mu estándar de b-gal

**Nota 1: Ajuste de la curva estándar para adaptarse a las condiciones experimentales específicas, tales como tipos de células o vector de plásmido.**

**Nota 2: Las diluciones para la curva estándar se deben preparar de nuevo cada vez que se lleva a cabo el ensayo.**

- 10 5. Añadir 50 µl de cada muestra/pocillo a la placa de ensayo.
6. Preparar un blanco por medio de la adición de 50 µl de tampón de lisis a un pocillo.
7. Añadir 100 µl de Solución de Sustrato ONPG a cada pocillo. Incubar la placa a temperatura ambiente hasta que se desarrolla el color amarillo (de aproximadamente menos de un minuto a 4 horas, dependiendo del tipo de célula).
- 15 8. Leer la absorbancia a 405 a 420 nm con un espectrofotómetro de microtitulación.
9. Cuantificar la expresión de β-galactosidasa basada en una curva estándar lineal.

#### **Ejemplo 7. Maduración de Afinidad de Anticuerpo**

Este protocolo describe el proceso completo de la mejora de la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno de destino.

#### 20 **Preparación de Fragmento ADNbc**

1. Ordenar los oligonucleótidos desde IDT (escala de 1mmol, purificado por PAGE, liofilizados y 5' **fosforilados**).
2. Centrifugar los oligos liofilizados en microcentrífuga a 12.000 x g durante 30 segundos antes de abrir los tubos.
3. Volver a suspender los oligos en H<sub>2</sub>O libre de nucleasa a 100 pmoles/µl de acuerdo con los datos obtenidos a partir de IDT.

## ES 2 741 175 T3

4. Incubar a 37 °C durante 30 min en un termomezclador a 1.000 RPM.
5. Centrifugar los oligos resuspendidos en microcentrifuga a 12.000 x g durante 30 segundos.
6. Combinar 75 µl de búsqueda de cebadores directos e inversos en tubos de PCR de pared delgada (o placas de PCR de 96 pocillos)
- 5 7. Recocer los oligonucleótidos en un termociclador por el uso del siguiente perfil de temperatura:  
5' a 94 °C → 5' a 90 °C → 5' a 85 °C → 5' a 80 °C → 5' a 75 °C → 5' a 70 °C → 5' a 65 °C → 5' a 60 °C → 5' a 55 °C → 5' a 50 °C → 5' a 45 °C → 5' a 40 °C → 5' a 35 °C → 5' a 30 °C
8. La concentración final para la concentración de fragmento de ADN de recocido es 50pMole/µl.
9. Guardar los fragmentos de ADN hibridados a -20 °C.

### 10 **Análisis de Control de Calidad**

1. Para fragmentos de ADNbc QC (o reuniones de fragmentos), crear las siguientes reacciones en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml:

Fragmentos de ADNbc	1 µl
Agua	20 µl
Tampón de carga de muestra	1 µl
<b>Total</b>	<b>22 µl</b>

2. Cargar 10 µl en un gel de agarosa TAE al 4% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 25 bp como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE (véase el Apéndice 1).

#### Apéndice 1: Recetas de Tampón

##### 50X tampón de TAE

- 242 g de base Tris
- 57,1 ml de ácido acético glacial
- 20 • 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro

##### 1X tampón de TAE

- 20 ml de 50X tampón de TAE
- 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

##### 25 0,1 M de DTT

- 1,54 g de DTT
- 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- Almacenar en -20 °C

##### 80% de glicerol

- 20 ml de glicerol
- 80 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- Esterilizar por medio de autoclave

Gel de Agarosa al 4% con bromuro de etidio

- 5
- 4 g de agarosa LE
  - 100 ml de 1X tampón de TAE
  - Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
  - Enfriar la agarosa a 55 °C
  - Añadir 2,5 µl de 20 mg/ml de Bromuro de Etidio a la agarosa
- 10
- Verter sobre una plataforma de gel

**Ejemplo 8. Cribado de Bibliotecas de Anticuerpos Totalmente humanos**

Este ejemplo describe el método de cribado de una presentación en la superficie de células de mamíferos biblioteca de anticuerpos totalmente humanos para aislar anticuerpos totalmente humanos con alta actividad de unión específica a un antígeno de destino por el uso de la combinación de la clasificación de citometría de flujo y ELISA.

15 **Análisis de Citometría de Flujo**

El proceso de selección se necesita optimizar para cada proyecto de acuerdo con la disponibilidad de antígenos etiquetados y anticuerpos secundarios. Este ejemplo se ha optimizado para el cribado y el aislamiento de anticuerpo anti-BioAtla 001 totalmente humano de alta afinidad.

- 20
1. Generar bibliotecas de anticuerpos totalmente humanos integradas de manera estable en células de mamíferos.
  2. Expandir clones de la biblioteca de anticuerpos totalmente humanos estable antes del análisis de citometría de flujo.
  3. En el día del análisis de citometría de flujo, lava  $1 \times 10^7$  células con 1 x PBS.
  4. Separar las células con medio de separación de células Detachin y recolectar las células en 1 x PBS.
- 25
5. Centrifugar las células a 3000 rpm durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante.
  6. Volver a suspender el sedimento celular en 1 ml de 1 x PBS frío y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
  7. Retirar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular en 500 µl de 2 µg/ml de proteína humana 001 purificada en 1 x PBS frío.
  8. Incubar en hielo durante 1 hora con mezcla a mano de vez en cuando.
- 30
9. Centrifugar las células a 3000 rpm durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante.
  10. Volver a suspender el sedimento celular en 1 ml de 1 x PBS frío y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
  11. Repetir los pasos 7 y 8.
  12. Retirar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular en 500 µl de 1 µg/ml de anticuerpo policlonal de conejo anti-humano 001 en 1 x PBS frío con suero de cabra al 10%.
- 35
13. Incubar en hielo durante 30 minutos con mezcla a mano de vez en cuando.

14. Centrifugar las células a 3000 rpm durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante.
15. Volver a suspender el sedimento celular en 1 ml de 1 x PBS frío y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
16. Repetir los pasos 7 y 8.
- 5 17. Retirar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular en 500 µl de conjugado de anticuerpo cabra anti-conejo conjugado con FITC y anticuerpo Fc de cabra anti-humano con piretrina en 1 x PBS frío con suero de cabra al 10%.
18. Incubar en hielo durante 30 minutos con mezcla a mano de vez en cuando.
19. Centrifugar las células a 3000 rpm durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante.
20. Volver a suspender el sedimento celular en 1 ml de 1 x PBS frío y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- 10 21. Repetir los pasos 7 y 8.
22. Retirar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular en 1 ml de 1 x PBS frío con suero de cabra al 2%.
23. Proceder con el análisis de citometría de flujo por el uso de Dako MoFlo.
- 15 24. Dibujar una ventana de tipo para incluir el 0,1% superior del total de células en términos de relación de la fluorescencia de PE/FITC. Recolectar las células que caen dentro de la ventana de tipo en placas de 96 pocillos con 100 µl de medio de crecimiento.

#### **Recuperación de Secuencias de Región Variable de Cadena Pesada y de Cadena Ligera**

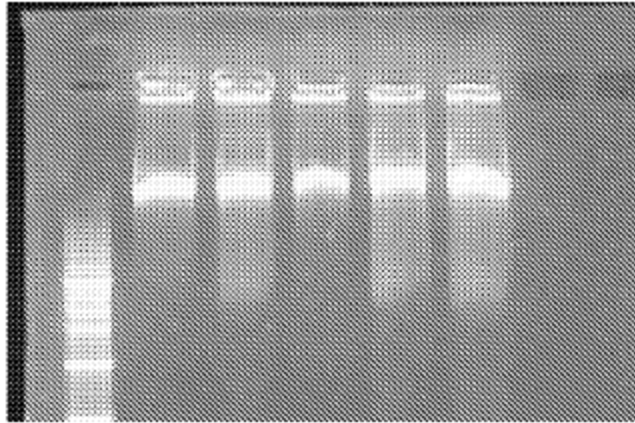
- 20 1. Expandir los clones a partir de placas de 96 pocillos a placas de 6 pocillos. Cuando las células alcanzan 80% de confluencia en las placas de 6 pocillos, continuar con el aislamiento de ADN genómico por el uso del kit de Tejido Qiagen DNeasy.
2. Aspirar el medio de las células. Añadir 500 µl de 1 x PBS a cada uno de los 6 pocillos. Raspar las células de la placa con puntas de pipeta estériles. Transferir las células raspadas en PBS a un tubo de microcentrifuga estéril.
3. Centrifugar las células durante 5 minutos a 3000 rpm.
4. Retirar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular en 200 µl 1 x PBS.
- 25 5. Añadir 20 µl de proteinasa K y 200 µl de Tampón AL a la muestra, mezclar bien por medio de un vórtice, e incubar a 56 °C durante 10 minutos.
6. Añadir 200 µl de etanol a la muestra y mezclar bien por medio de un vórtice.
7. Pipetear la mezcla del paso 6 en una columna de centrifugación. Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Desechar el flujo de filtrado.
- 30 8. Añadir 500 µl de tampón AW1 y centrifugar durante un minuto a 8000 rpm. Desechar el flujo de filtrado.
9. Añadir 500 µl de Tampón AW2 y centrifugar durante 2 minutos. a 14.000 rpm. Desechar el flujo de filtrado. Centrifugar de nuevo durante un minuto a 14.000 rpm. Asegurarse de que la membrana esté completamente seca.
10. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de microcentrifuga estéril y pipetear 200 µl de Tampón AE directamente sobre la membrana.
- 35 11. Incubar a temperatura ambiente durante un minuto y centrifugar durante un minuto a 8.000 rpm para eluir el ADN genómico.
12. QC el ADN genómico por medio del establecimiento de las siguientes reacciones en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml:



## ES 2 741 175 T3

ADNg	5 $\mu$ l
10x Tampón de carga de muestra	5 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>	
	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Cargar en un gel de agarosa TAE al 0,8% con 0,5  $\mu$ g/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 1kB como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.



13. Configurar las siguientes reacciones de PCR en tubos de PCR estériles:

ADNg	1 $\mu$ l
2x Mezcla Maestra de Taq HotStar	12,5 $\mu$ l
Cebador directo de dominio variable	0,5 $\mu$ l
Cebador inverso de dominio variable	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	10,5 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>	
	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

5 14. Colocar los tubos de PCR en el termociclador e iniciar el programa de ciclado.

Paso de activación inicial: 15 minutos, 95 °C

Ciclado de 3 pasos

Desnaturalización: 40 segundos, 94 °C

Recocido: 40 segundos, 55 °C

10 Extensión: 2 minutos, 72 °C

Número de ciclos: 30

Paso final de extensión: 10 minutos, 72 °C

15. QC las reacciones de PCR por medio de la creación de las siguientes reacciones en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml:

Reacción de PCR	5 $\mu$ l
-----------------	-----------

## ES 2 741 175 T3

10x Tampón de carga de muestra	5 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Cargar en un gel de agarosa TAE al 1% con 0,5  $\mu$ g/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 1kB como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.

16. Establecer las siguientes reacciones de clonación en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml por el uso del kit de Invitrogen TOPO 2,1:

Reacción de PCR	4 $\mu$ l
Solución de Sal	1 $\mu$ l
Vector TOPO	1 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>	<b>6 <math>\mu</math>l</b>

- 5 17. Mezclar las reacciones suavemente e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Añadir 2 ml de la reacción de clonación TOPO del paso 17 en un vial de *E. coli* químicamente competente One Shot y mezclar suavemente.
19. Incubar en hielo durante 30 minutos.
20. Dar un choque térmico de las células durante 30 segundos a 42 °C.
- 10 21. Transferir los tubos en hielo e incubar durante 2 minutos.
22. Añadir 250  $\mu$ l de medio SOC a temperatura ambiente.
23. Agitar los tubos horizontalmente a 37 °C durante una hora a 200 rpm.
24. Distribuir 10  $\mu$ l de la transformación en una placa de LB-carbenicilina recalentada.
25. Incubar la placa hasta el día siguiente a 37 °C.
- 15 26. Recoger 6 clones de cada transformación para la secuenciación.
27. Analizar las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera. Proceder a la segunda ronda de cribado por medio del método de ELISA.

### **Digerir el vector pBA y los Clones de Anticuerpos Totalmente Humanos con NheI y AgeI**

Preparar las siguientes reacciones de digestión en un tubo de microcentrifuga en hielo:

pBAk-LacZ (2 mg)	x $\mu$ l
10X Tampón NEB x	x 10 $\mu$ l
Agua libre de nucleasa	QS a 97 $\mu$ l
AgeI (10 U/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
NheI (10 U/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>
Clones de anticuerpos totalmente humanos (5 ug)	x $\mu$ l

## ES 2 741 175 T3

10X NEB Tampón x	10 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 97 µl
Agel (10 U/µl)	3 µl
Nhel (10 U/µl)	3 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	
	<b>100 µl</b>

1. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
2. Incubar la reacción a 37 °C hasta el día siguiente.

### **Vector pBA digerido por NheI/Agel CIP y Purificar con el Kit de Purificación de PCR QIAquick**

3. Añadir 2 ml de fosfatasa Apex al tubo de microcentrífuga que contiene la reacción de digestión pBAk-LacZ.
- 5 4. Incubar a 37 °C durante 10 minutos.
5. Calentar a 70 °C durante 5 minutos para inactivar la fosfatasa Apex.
6. Añadir 500 µl de Tampón PBI a la microcentrífuga.
7. Mezclar por medio de un vórtice y centrifugar rápidamente.
8. Cargar 750 µl a la vez en una columna.
- 10 9. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y decantar el líquido del tubo de recolección.
10. Repetir hasta que todas las muestras se hayan procesado.
11. Lavar con 750 µl de Tampón PE (¡Etanol añadido!)
12. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y decantar el líquido del tubo de recolección.
13. Colocar la columna de nuevo en el tubo de recolección y centrifugar de nuevo.
- 15 14. Poner la columna sobre nuevos tubos de microcentrífuga y eluir con 50 µl de Tampón EB.

### **Purificar por gel los Clones de Anticuerpos Totalmente Humanos Digeridos por NheI/Agel**

1. Configurar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Clones de anticuerpos totalmente humanos digeridos por NheI/SCII	100 µl
10x Tampón de carga de muestra	3 µl
<b>Volumen Total</b>	
	<b>103 µl</b>

2. Cargar en un gel de agarosa TAE al 1% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Utilizar una escalera de ADN de 1kB como estándar. Ejecutar el gel a 100 V durante 20 a 30 minutos en 1X de tampón de TAE.
- 20 3. Recortar las bandas correspondientes a las regiones variables de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) y purificar por el uso del kit de Extracción de Gel QIAquick.
4. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel.
5. Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el corte de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

## ES 2 741 175 T3

6. Colocar una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml proporcionado.
7. Aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar durante 1 minuto.
8. Desechar el flujo de filtrado y colocar la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo de recolección.
9. Añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 5 10. Desechar el flujo de filtrado y centrifugar la columna QIAquick durante un 1 minuto adicional en 17.900 x g (13.000 rpm).
11. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
12. Añadir 52 µl de tampón EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y centrifugar durante 1 minuto.

### 10 **Ligar el Dominio Variable de HC y LC Totalmente Humano en vector pBAk-LacZ digerido por NheI/AgeI**

Preparar la siguiente reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga en hielo:

pBAk-LacZ-NheI/AgeI (100 ng)	x µl
Dominio variable de HC y LC totalmente humano	Y µl
5X Tampón de ligasa T4	4 µl
Agua libre de nucleasa	QS a 19 µl
Ligasa T4 (2.000 U/µl)	1 µl
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>20 µl</b>

1. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en una microcentrífuga.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas o a 16 °C hasta el día siguiente.
3. Transformar cada una de las mezclas de reacción de ligación en células de *E. coli* BioAtla supercompetentes.
- 15 4. Enfriar previamente tubos de fondo redondo de 14 ml de polipropileno BD Falcon en hielo. Preparar medio SOC a 42 °C.
5. Descongelar las células BioAtla Supercompetentes en hielo. Cuando se descongelan, mezclar suavemente y dividir en alícuotas 100 µl de células en cada uno de los tubos enfriados previamente.
- 20 6. Añadir 1,7 µl de β-mercaptoetanol a cada alícuota de células. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos.
7. Añadir 2 µl de la mezcla de reacción de ligación a una alícuota de células. Mover los tubos suavemente.
8. Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.
9. Pulsar con calor los tubos en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos.
10. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos.
- 25 11. Añadir 900 µl de Medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37 °C durante 1 hora con agitación a 225 a 250 rpm.
12. Colocar 20 µl y 200 µl de la mezcla de transformación en placas de agar LB que contienen carbenicilina.
13. Incubar las placas a 37 °C hasta el día siguiente.

14. Contar las colonias en las placas y recolectar 6 colonias para el cribado y la secuenciación de PCR.
15. Elegir un clon con la secuencia correcta, preparar ADN de plásmido, y proceder a la transfección en células 293F.

#### **Transfección de células 293F**

- 5 1. Una semana antes de la transfección, transferir 293F células a una monocapa de cultivo en Medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero (D-MEM).
2. Un día antes de la transfección, colocar en placas 0,1 x 10<sup>5</sup> células en 100 µl de D-MEM suplementado con suero por muestra de transfección en formatos de 96 pocillos.
3. Para cada muestra de transfección, preparar complejos de ADN-Lipofectamina.
- 10 4. Diluir 0,2 µg de ADN en 50 µl de Medio con Suero Reducido Opti-MEM. Mezclar suavemente.
5. Diluir 0,125 µl de Lipofectamina en 50 µl de Medio con Suero Reducido Opti-MEM. Mezclar suavemente e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Combinar el ADN diluido con la Lipofectamina diluida. Mezclar suavemente e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- 15 7. Añadir los complejos de ADN-Lipofectamina 100 µl a cada pocillo que contiene células y medio. Mezclar suavemente por medio del balanceo de la placa de un lado a otro.
8. Incubar las células a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5%.
9. Añadir 100 µl de D-MEM suplementado con suero a cada pocillo después de 6 horas. Incubar las células a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% hasta el día siguiente.
- 20 10. Aspirar el medio en cada pocillo. Lavar cada pocillo con 100 µl de 293 SFM II con 4 mM de L-glutamina. Añadir 100 µl de 293 SFM II con 4 mM de L-glutamina a cada pocillo.
11. Recolectar el sobrenadante por medio de ELISA 96 horas después de la transfección.

#### **ELISA Funcional**

- 25 1. Recubrir placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 100 µl de antígeno de 2 µg/ml en solución de recubrimiento.
2. Cubrir las placas con selladores e incubarlas hasta el día siguiente a 4 °C.

#### **ELISA de Cuantificación**

1. Recubrir placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 100 µl de 10 µg/ml IgG de cabra anti-humana específica de Fc purificada por afinidad en solución de recubrimiento.
- 30 2. Cubrir las placas con selladores e incubarlas hasta el día siguiente a 4 °C.

#### **ELISA Funcional**

3. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
4. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
- 35 6. Añadir 200 µl de solución de bloqueo. Agitar a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.

## ES 2 741 175 T3

8. Añadir duplicados de 100 µl/pocillo de anticuerpo de control (2 µl/ml) en una solución de bloqueo a las placas.
9. Añadir duplicados de 100 µl de sobrenadante de la transfección a las placas.
10. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
11. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
- 5 12. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
13. Repetir los pasos 11 y 12 3 veces.
14. Añadir 100 µl de una dilución 1:5000 del conjugado de anticuerpo de cabra anti-humano purificado por afinidad con HRP en una solución de bloqueo a cada pocillo.
15. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
- 10 16. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
17. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
18. Repetir los pasos 17 y 18 3 veces.
19. Añadir 100 µl de sustrato Sigma TMB a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y comprobar cada 2 a 5 minutos.
- 15 20. Añadir 100 µl en HCl para detener la reacción.
21. Leer a 450 nm.

### **ELISA de Cuantificación**

1. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
2. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
- 20 3. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
4. Añadir 200 µl de solución de bloqueo. Agitar a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el residuo líquido.
6. Añadir duplicados de 100 µl/pocillo de concentración estandarizada de IgG sérica humana purificada en una solución de bloqueo a las placas.
- 25 7. Añadir duplicados de 100 µl de sobrenadante de la transfección a las placas.
8. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
9. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.
10. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
11. Repetir los pasos 11 y 12 3 veces.
- 30 12. Añadir 100 µl de una dilución 1:5000 del conjugado de anticuerpo de cabra anti-humano purificado por afinidad con HRP en una solución de bloqueo a cada pocillo.
13. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
14. Decantar las placas y golpear ligeramente hacia fuera el líquido residual.

15. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
16. Repetir los pasos 17 y 18 3 veces.
17. Añadir 100 µl de sustrato Sigma TMB a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y comprobar cada 2 a 5 minutos.
- 5 18. Añadir 100 µl en HCl para detener la reacción.
19. Leer a 450 nm.

**Apéndice 1: Recetas de Tampón**

1 x PBS con suero de cabra al 2%

- 2 ml de suero de cabra
- 10 • 98 ml de 1 x PBS

50X tampón de TAE

- 242 g de base Tris
- 57,1 ml de ácido acético glacial
- 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O
- 15 • Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro

1X tampón de TAE

- 20 ml de 50X tampón de TAE
- 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

0,8% de Gel de Agarosa con bromuro de etidio

- 20 • 0,8 g de agarosa LE
- 100 ml de 1X tampón de TAE
- Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
- Enfriar la agarosa a 55 °C
- Añadir 2,5 µl de 20 mg/ml de Bromuro de Etidio a la agarosa

- 25 • Verter sobre una plataforma de gel

1% de Gel de Agarosa con bromuro de etidio

- 1 g de agarosa LE
- 100 ml de 1X tampón de TAE
- Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
- 30 • Enfriar la agarosa a 55 °C
- Añadir 2,5 µl de 20 mg/ml de Bromuro de Etidio a la agarosa

- Verter sobre una plataforma de gel

LB

- 10 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 • 5 g de extracto de levadura
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5N
- Someter a autoclave

Agar de LB-carbenicilina

- 10 • 10 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 20 g de agar
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- 15 • Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5N
- Someter a autoclave
- Enfriar a 55 °C
- Añadir 10 ml de 10 mg/ml de carbenicilina esterilizada por filtración
- Verter en placas de Petri (25 ml/placa de 100 mm)

20 Medio SOC

- 0,5 g de NaCl
- 20 g de triptona
- 0,5 g de extracto de levadura
- 2 ml de glucosa al 20% esterilizada por filtración
- 25 • Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- Someter a autoclave
- Añadir 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M esterilizada por filtración y 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M esterilizada por filtración antes de su uso

Solución de lavado

- 30 • 0,05% de Tween-20 en PBS

Solución de bloqueo



- 2% de leche no grasa Carnation en PBS

### **Ejemplo 9. Evolución de Sinergia**

5 Este ejemplo describe el método de creación de cambios de aminoácidos específicos en un constructo de expresión de proteínas y la identificación de las posiciones y las mutaciones que no afectan el rendimiento/actividad de la proteína de destino.

Utilizar la CPE para crear los 19 mutaciones de aminoácidos individuales en la molécula de destino en las posiciones 2 - n (n = residuo C-terminal de la molécula) o cualquier otro intervalo o posiciones definidas.

10 Recolectar 96 clones/codón en placas de pocillos profundos que contenían 1200 µl de LB con antibiótico apropiado (proyecto/constructo de expresión específico). Sellar las placas con y cultivar hasta el día siguiente a 37 °C, por medio de agitación a 225 rpm.

Replicar los cultivos de una noche en nuevas placas de 96 pocillos, cultivarlas hasta el día siguiente a 37 °C.

Miniprep el ADN de plásmido a partir de cultivos hasta el día siguiente (kit de miniprep de 96 pocillos libre de endotoxinas Qiagen).

Hacer reservas de glicerol a partir de cultivos de una noche (placas de réplica).

15 Transfectar los clones en células HEK293F.

Recolectar el sobrenadante para ELISA de cuantificación y ELISA funcional específica del proyecto.

### **Apéndice 1: Recetas de Tampón**

50X tampón de TAE

- 242 g de base Tris
- 20 • 57,1 ml de ácido acético glacial
- 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro

1X tampón de TAE

- 20 ml de 50X tampón de TAE
- 25 • 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

1% de Gel de Agarosa con bromuro de etidio

- 1 g de agarosa LE
- 100 ml de 1X tampón de TAE
- Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
- 30 • Enfriar la agarosa a 55 °C
- Añadir 2,5 µl de 20 mg/ml de Bromuro de Etidio a la agarosa
- Verter sobre una plataforma de gel

LB

- 10 g de NaCl

- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5N

5 • Someter a autoclave

Agar de LB-carbenicilina

- 10 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura

10 • 20 g de agar

- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5N
- Someter a autoclave
- Enfriar a 55 °C

15 • Añadir 10 ml de 10 mg/ml de carbenicilina esterilizada por filtración

- Verter en placas de Petri (25 ml/placa de 100 mm)

Medio SOC

- 0,5 g de NaCl
- 20 g de triptona
- 0,5 g de extracto de levadura
- 2 ml de glucosa al 20% esterilizada por filtración
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro
- Someter a autoclave

25 • Añadir 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M esterilizada por filtración y 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M esterilizada por filtración antes de su uso

**Ejemplo 10. Generación y Cribado de una Biblioteca Variante de Codones de Fc para la Expresión Óptima de Anticuerpos**

30 El presente ejemplo proporciona métodos para la generación de una biblioteca variante de Fc de codones y los métodos de cribado para la obtención de variantes de Fc con optimizado para mejorar la expresión en células huéspedes de producción en comparación con la forma parental del polipéptido Fc.

A. Diseño y Construcción de una biblioteca de variante de codón de Fc

Para cada codón en el área de destino (en este caso, la parte Fc de la molécula de IgG1 humana) se diseña un par de cebadores degenerados (directos e inversos) que incluyen el codón de destino y 20 bases en cada lado. La tercera posición del codón de destino (posición de tambaleo) contiene bases mixtas (Tabla 3) que permiten la

generación de todas las mutaciones silenciosas en la posición de destino por el uso del mismo codón (ejemplo A). Un segundo conjunto de cebador degenerado se diseña para la misma posición de codón de si el aminoácido correspondiente se puede codificar por otro codón (ejemplo B). Los cebadores correspondientes directos e inversos degenerados se mezclan 1:1, se recocen con la plantilla y se extienden a productos de longitud completa por medio de desplazamiento de cadena por el uso de una ADN polimerasa termoestable. La plantilla se digiere con DpnI y los productos de extensión de longitud completa se transformaron en *E. coli*. Se secuencian hasta 12 colonias por reacción de mutagénesis. Los mutantes de la secuencia confirmada se disponen en placas de 96 pocillos y glicerol reservado. Las reservas de glicerol se utilizan para miniprep. de ADN de plásmido para su transfección en células de mamíferos el cribado.

5

10

Tabla 3: Códigos para bases degeneradas en oligos sintéticos

Símbolo	Base Mixta
R	A, G
Y	C, T
M	A, C
K	G, T
S	C, G
W	A, T
H	A, C, T
B	C, G, T
V	A, C, G
D	A, G, T
N	A, C, G, T

Ejemplo A: codón de destino = CCC (prolina)

→ cebador directo: CCD, cebador inverso: HGG

Ejemplo B; codón de destino = TCG (serina)

→ cebador directo 1: TCH, cebador inverso 1: DGA

15 → cebador directo 2: AGY, cebador inverso 2: RCT

No se muestran 20 bases que flanquean el codón de destino. Longitud total del cebador: 43 bases.

B. Expresión y cribado basado en ELISA de la biblioteca de variante de codón de Fc

20 Los clones de la biblioteca variante de Fc codón se transfectaron en una línea celular de mamífero. Se produjeron y se secretaron IgG de longitud completa en el medio. Los sobrenadantes de las variantes de codón de Fc expresadas se cribaron para el nivel de expresión de IgG más alto que el clon parental por el uso del ensayo de ELISA. Los datos de ELISA se normalizaron con el ensayo de beta-galactosidasa que medía la eficiencia de la transfección. Los impactos superiores identificados en el cribado primario se transfectaron y se cribaron nuevamente tres veces para confirmar el incremento del nivel de expresión. La Figura 3 muestra el nivel de expresión de IgG de las seis variantes de Fc superiores impactadas (las seis barras de la derecha) que se expresan en el nivel más alto en una línea celular de mamífero en comparación con el constructo de tipo salvaje de Fc parental (la barra de la izquierda).

25

## REIVINDICACIONES

1. Un método de mapeo de polipéptidos mutantes formados a partir de un polipéptido plantilla, el método comprende:

a. la generación de uno de:

5 I.  $n-1$  conjuntos separados de polipéptidos mutantes del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, cada conjunto comprende polipéptidos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada del polipéptido plantilla; en el que cada conjunto de polipéptidos mutantes se diferencia del polipéptido plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de polipéptidos mutantes diferentes generados es equivalente a  $(n-1) \times X$ , en el que  $X$  representa los 19 residuos de aminoácidos de origen natural que no están presentes en una posición dada del polipéptido plantilla;

15 II.  $n$  conjuntos separados de anticuerpos mutantes del polipéptido plantilla que es un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad en la que  $n$  es el número de aminoácidos en la por lo menos una región determinante de complementariedad, cada dicho conjunto comprende anticuerpos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada de la por lo menos una región determinante de complementariedad; en el que cada uno de dicho conjunto de anticuerpos mutantes se diferencia del anticuerpo plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos mutantes diferentes generados es equivalente a  $n \times X$ , en el que  $X$  representa los 19 residuos de aminoácidos de origen natural que no están presentes en una posición dada del polipéptido plantilla;

20 III.  $n-1$  o  $n-2$  en el caso en el que el residuo inicial sea metionina, polipéptidos mutantes separados del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, en el que cada polipéptido mutante se diferencia del polipéptido plantilla en que un aminoácido se elimina en sólo una única posición predeterminada; y

25 IV.  $20 \times (n-1)$  polipéptidos mutantes separados del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, en el que cada polipéptido mutante se diferencia del polipéptido plantilla en que ha insertado después de una posición específica en el polipéptido plantilla sólo uno de cada uno de los 20 aminoácidos de origen natural;

b. el ensayo de cada polipéptido mutante en los pasos I, III o IV, o cada anticuerpo mutante en el paso II, para por lo menos una propiedad, característica o actividad predeterminada;

30 c. para cada polipéptido mutante generado en los pasos I, III o IV, o cada anticuerpo mutante generado en el paso II la identificación de cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad en relación con el polipéptido plantilla; y

35 d. la creación de un mapa funcional que se utiliza para identificar (a) las posiciones y las mutaciones que no afectan a dicha propiedad, característica o actividad del polipéptido o anticuerpo mutante en comparación con el polipéptido plantilla; (b) sitios completamente mutables en comparación con el polipéptido plantilla; y (c) las posiciones y las mutaciones que dan como resultado un polipéptido mutante con una mejora de dicha propiedad, característica o actividad en comparación con el polipéptido plantilla,

40 en el que la mejora se selecciona de la reducción de la agregación de proteína-proteína, la mejora de la estabilidad de proteínas, el incremento de la solubilidad de proteínas, el incremento de la estabilidad del pH de proteínas, el incremento de la estabilidad de la temperatura de proteínas, el incremento de la estabilidad del solvente de proteínas, el incremento de la selectividad, la disminución de la selectividad, la introducción de sitios de glicosilación, la introducción de sitios de conjugación, la reducción de la inmunogenicidad, la mejora de la expresión de proteínas, el incremento de la afinidad por el antígeno, la disminución de la afinidad por el antígeno, un cambio en la afinidad de unión, un cambio en la inmunogenicidad, un cambio en la actividad catalítica, la optimización del pH, y la mejora de la especificidad.

45 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de generación comprende:

I. la generación de  $n-1$  conjuntos separados de polipéptidos mutantes del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, cada conjunto comprende polipéptidos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada del polipéptido plantilla; en el que cada conjunto de polipéptidos mutantes se diferencia del polipéptido plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de polipéptidos mutantes diferentes generados es equivalente a  $(n-1) \times X$ , y

X representa los 19 residuos de aminoácidos de origen natural que no están presentes en una posición dada del polipéptido plantilla.

**3.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho paso de generación comprende:

5 I. la generación de  $n-1$  conjuntos separados de polipéptidos mutantes del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, cada conjunto comprende polipéptidos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada del polipéptido plantilla; en el que cada conjunto de polipéptidos mutantes se diferencia del polipéptido plantilla sólo en la única posición predeterminada;

y el número de polipéptidos mutantes diferentes generados es equivalente a  $(n-1) \times X$  por:

10 i. el sometimiento de un polinucleótido que contiene codones que codifica para dicho polipéptido plantilla para la amplificación basada en polimerasa por el uso de un oligonucleótido degenerado 64 veces para cada codón a mutagenizar, en el que cada uno de dichos oligonucleótidos degenerados 64 veces está compuesto por una primera secuencia homóloga y una secuencia triplete N,N,N degenerada, con el fin de generar un conjunto de polinucleótidos de progenie; y

15 ii. el sometimiento de dicho conjunto de polinucleótidos de progenie a una amplificación clonal de manera tal que se expresen los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de progenie.

**4.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho paso de generación comprende:

20 I. la generación de  $n$  conjuntos separados de anticuerpos mutantes del polipéptido plantilla que es un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad en la que  $n$  es el número de aminoácidos en la por lo menos una región determinante de complementariedad, cada dicho conjunto comprende anticuerpos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada de la por lo menos una región determinante de complementariedad; en el que cada uno de dicho conjunto de anticuerpos mutantes se diferencia del anticuerpo plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos miembro diferentes generados es equivalente a  $n \times X$ ; y

25 en el que dicha propiedad, característica o actividad predeterminada es por lo menos una de afinidad de unión e inmunogenicidad, y

X representa los 19 residuos de aminoácidos de origen natural que no están presentes en una posición dada del polipéptido plantilla.

**5.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho paso de generación comprende:

30 II. la generación de  $n$  conjuntos separados de anticuerpos mutantes del polipéptido plantilla que es un anticuerpo plantilla que tiene por lo menos una región determinante de complementariedad en la que  $n$  es el número de aminoácidos en la por lo menos una región determinante de complementariedad, cada dicho conjunto comprende anticuerpos mutantes que tienen un número  $X$  de residuos de aminoácidos predeterminados diferentes en una única posición predeterminada de la por lo menos una región determinante de complementariedad; en el que cada uno de dicho conjunto de anticuerpos mutantes se diferencia del anticuerpo plantilla sólo en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos mutantes diferentes generados es equivalente a  $n \times X$ , en el que  $X$  representa los 19 residuos de aminoácidos de origen natural que no están presentes en una posición dada del polipéptido plantilla; y en el que la por lo menos una región determinante de complementariedad en el anticuerpo plantilla es seis regiones determinantes de complementariedad, dichas seis regiones determinantes de complementariedad juntas comprenden  $n$  residuos de aminoácidos.

**6.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho paso de generación comprende,

45 III. la generación de  $n-1$  o  $n-2$  en el caso en el que el residuo inicial sea metionina, polipéptidos mutantes separados del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, en el que cada polipéptido mutante se diferencia del polipéptido plantilla en que sólo un aminoácido se elimina en una única posición predeterminada.

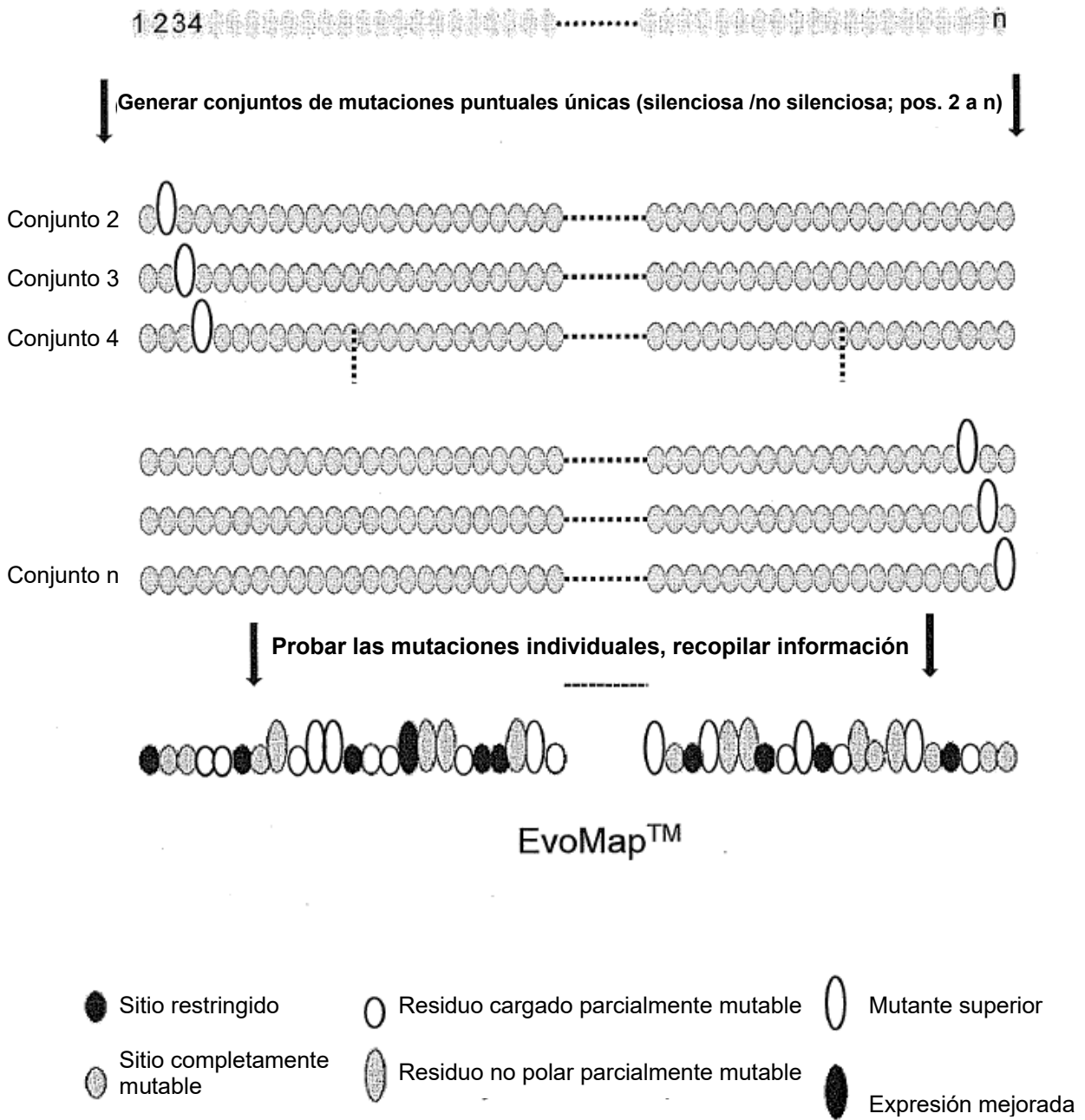
**7.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de generación comprende:

IV. la generación de  $20 \times (n-1)$  polipéptidos mutantes separados del polipéptido plantilla, en el que  $n$  es el número de aminoácidos en el polipéptido plantilla, en el que cada polipéptido mutante se diferencia del polipéptido plantilla en

que ha insertado después de una posición específica en la plantilla sólo uno de cada uno de los 20 aminoácidos de origen natural.

- 5 **8.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de generación (a) además comprende la confirmación por medio de secuenciación de la presencia del residuo de aminoácido predeterminado previsto en la única posición predeterminada en cada polipéptido mutante en cada conjunto de polipéptidos mutantes.

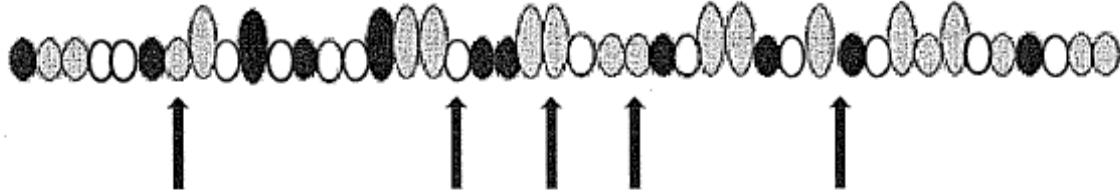
Secuencia de aminoácidos



**Figura 1:** Se utiliza la evolución posicional comprensiva (CPE) para generar una base de datos específica para las moléculas (EvoMap™).

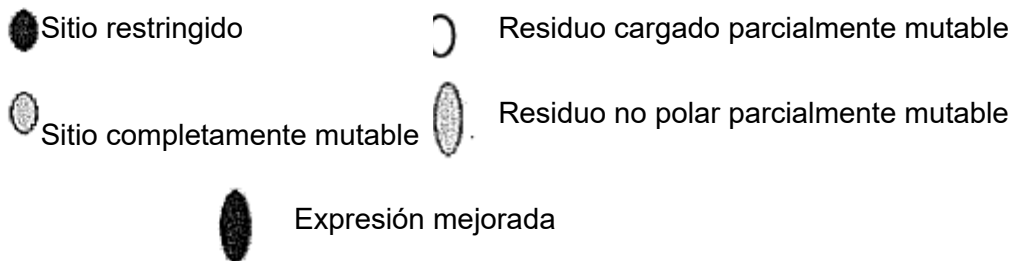
**Figura 1**

## EvoMap™



**Seleccionar hasta 20 residuos en proximidad a sitios restringidos para la mutación simultánea, incluir sólo los cambios permitidos de acuerdo con la información de EvoMap™**

- *Simultaneous mutations (5-20 a.a.) for combinatorial effects*  
Mutaciones simultáneas (5 a 20 a.a.) para efectos combinatoriales
- No requiere estructura cristalina de la proteína
- Útil para proteínas con alta variación de ensayo y otros efectos de múltiples sitios



**Figura 2:** Evolución de Sinergia: Optimización de proteínas con ensayos insensibles en situaciones en las que se necesitan múltiples cambios

**Figura 2**



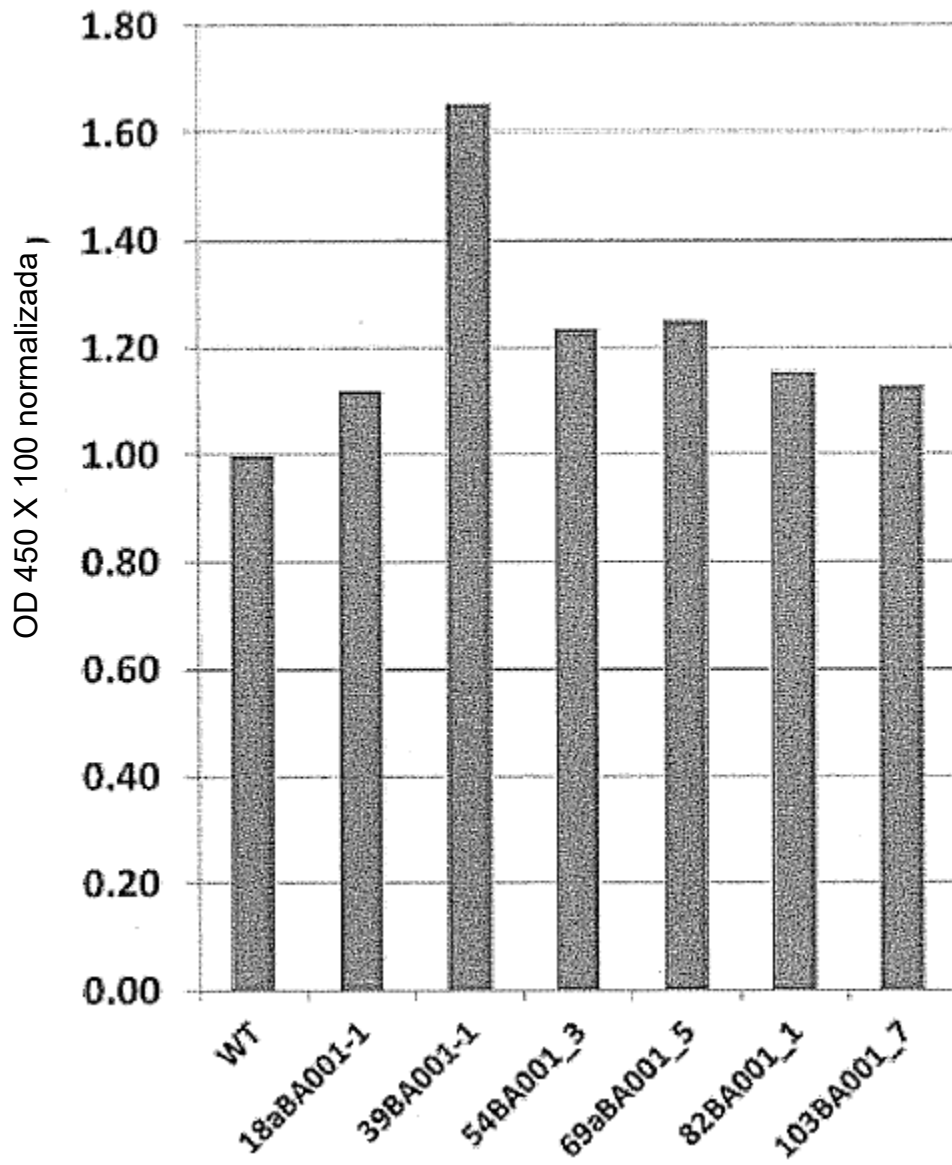


Figura 3

**CPI™ - Evolución de Inserción Posicional Comprensiva**

**Insertos hasta 20 aminoácidos individuales en cada  
posición amino única a lo largo de la proteína**

Ácido Nucleico

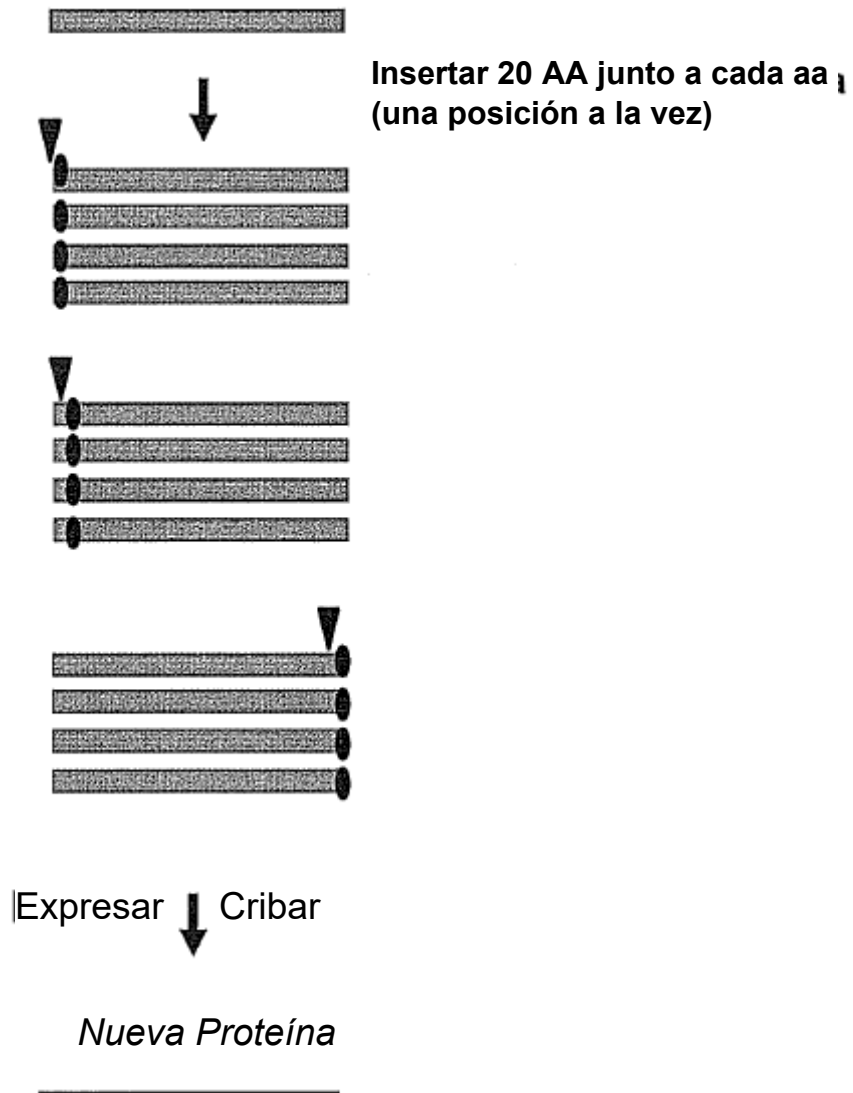


Figura 4

**Evolución Posicional Comprensiva (CPE™)**

**Ácido Nucleico Alargado de la CPI**

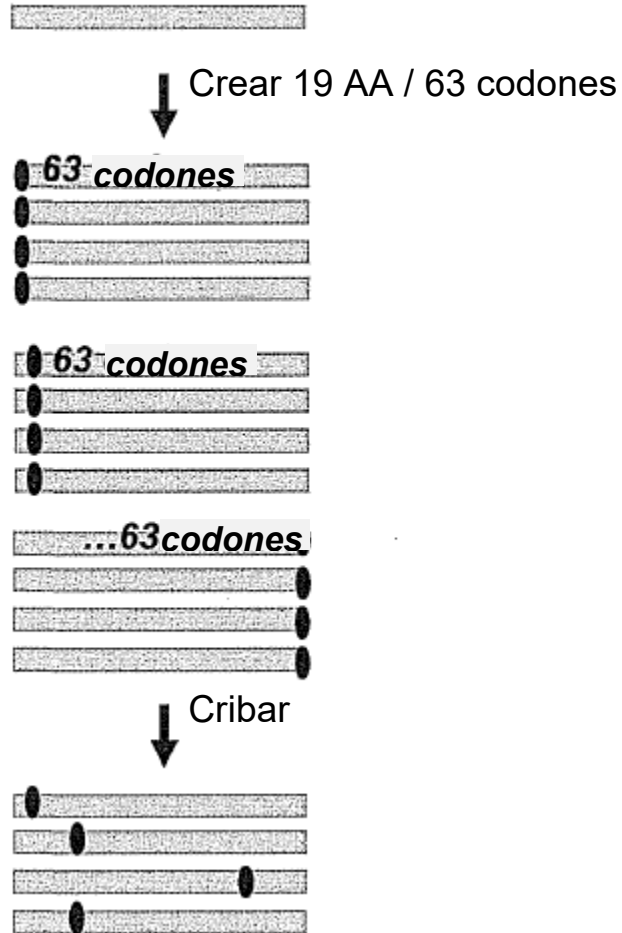
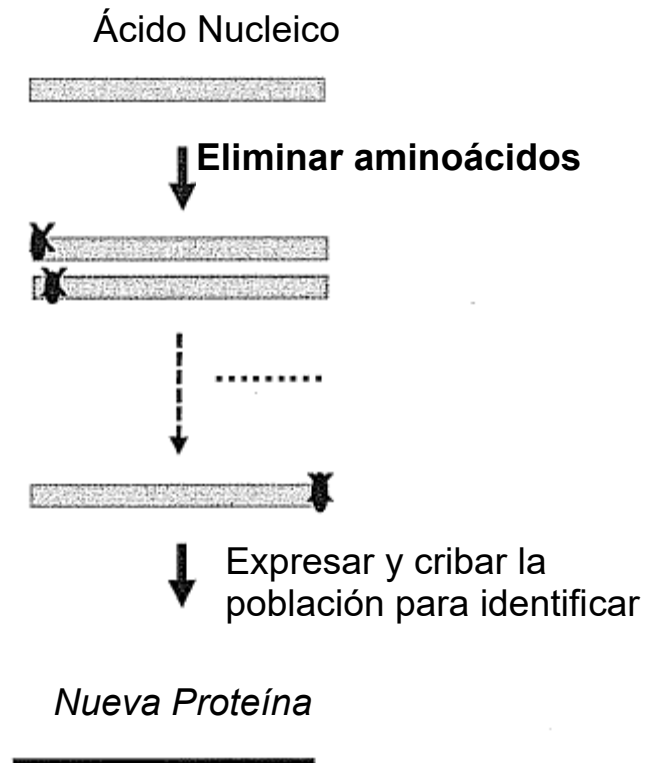


Figura 5

**CPD™ - Evolución de Supresión Posicional Comprensiva**

Elimina todos los aminoácidos a través de una proteína, una posición a la vez



1

Figura 6

**Evolución Posicional Comprensiva (CPE™)**

**Ácido Nucleico Acortado de la CPD**

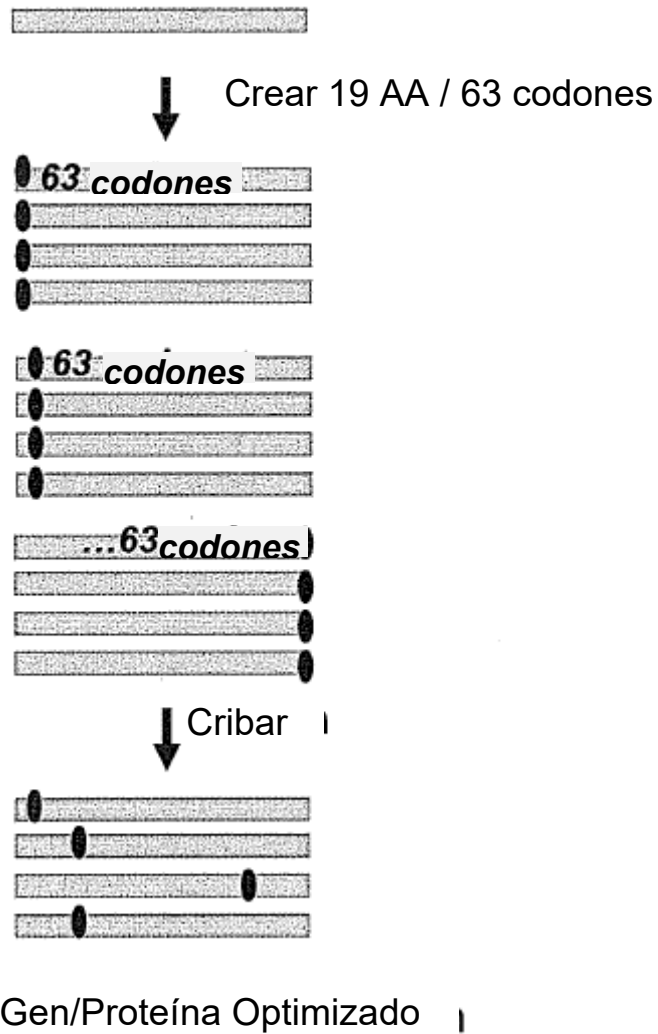


Figura 7

**Síntesis de Proteínas Combinatoria**

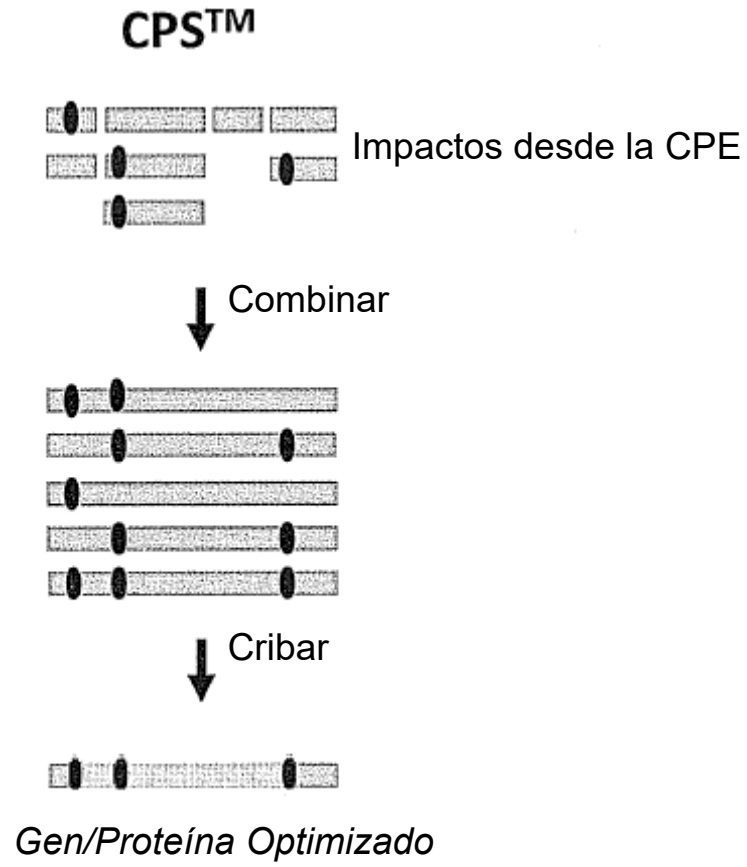
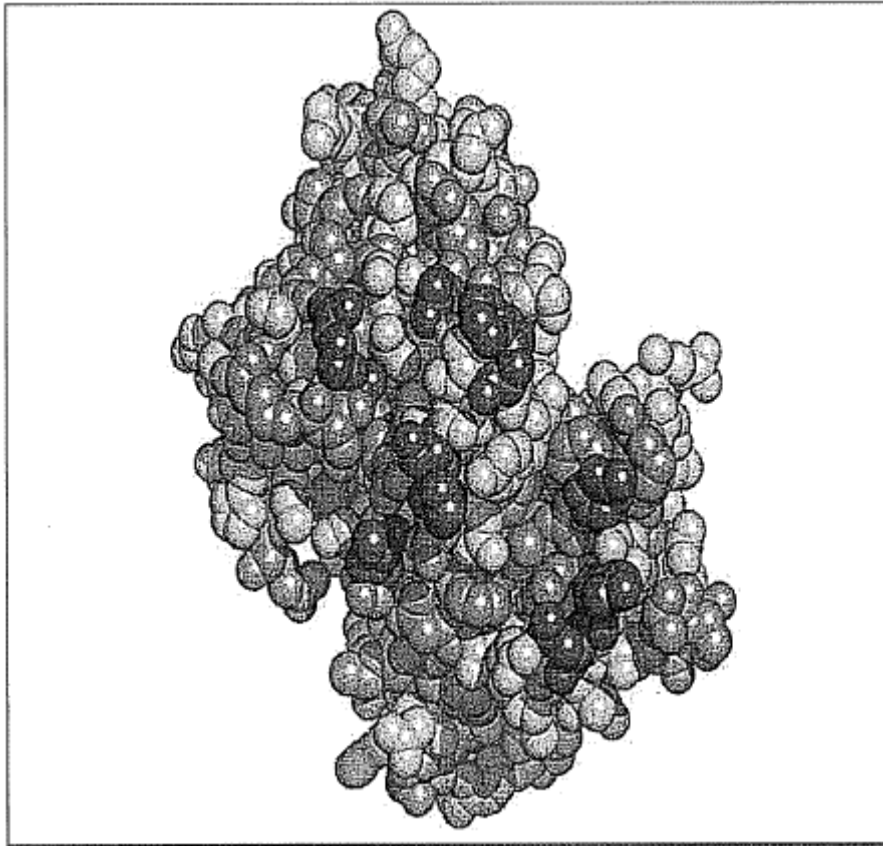


Figura 8



Mapa de Evolución Posicional Comprensiva  
(Dominios variables LC/HC de anticuerpo)

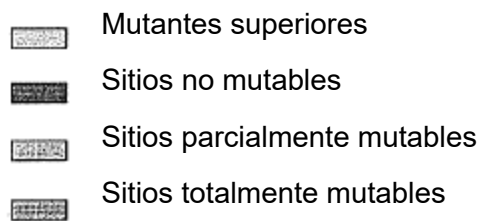


Figura 9