



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 198**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98930131 .2**

86 Fecha de presentación : **12.06.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0985039**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2000**

54 Título: **Polipéptidos artificiales de anticuerpos.**

30 Prioridad: **12.06.1997 US 49410 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es:
Novartis International Pharmaceutical Ltd.
Hurst Holme, 12 Trott Road
Hamilton HM 11, BM

72 Inventor/es: **Koide, Shohei**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 301 198 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos artificiales de anticuerpos.

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de la producción y selección de polipéptidos de fijación y catalíticos por los procedimientos de biológica molecular, utilizando tanto la química combinatoria como el ADN recombinante. La invención se refiere específicamente a la generación tanto de bancos de ácidos nucleicos como de polipéptidos derivados de los mismos que codifican el andamiaje molecular de fibronectina tipo III (Fn3) modificada en una o más de sus zonas bucle. La invención se refiere también a los “minianticuerpos artificiales” o “monocuerpos”,
10 es decir, los polipéptidos que comprenden un andamio de Fn3 en los que se han injertado las zonas bucles capaces de unirse a una mayoría de diferentes estructuras moleculares (tales como los puntos de fijación al anticuerpo).

Antecedentes de la invención15 *Estructura del anticuerpo*

Un anticuerpo convencional (Ab) es una estructura tetrámera constituida por dos cadenas pesadas idénticas de inmunoglobulina (Ig) y dos cadenas ligeras idénticas. Las cadenas pesadas y ligeras de un Ab están constituidas por dominios diferentes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL), mientras que
20 cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH) y tres o cuatro dominios constantes (CH) (Alzari *et al.*, 1988). Cada dominio, constituido por ~110 restos de aminoácido, está plegado en una estructura característica en sándwich β formada por dos láminas β envueltas una en la otra, el pliegue de inmunoglobulina. Cada uno de los dominios VH y VL tienen tres zonas determinantes de complementariedad (CDR1-3) que son bucles, o espiras, que conectan las cadenas β en un extremo de los dominios (Fig. 1: A, C). Las zonas variables tanto de las cadenas ligeras como
25 de las pesadas generalmente contribuyen a la especificidad del antígeno, aunque la contribución de cada una de las cadenas a la especificidad no siempre es igual. Las moléculas de anticuerpo han evolucionado para unirse a un gran número de moléculas utilizando seis bucles al azar (CDR). Sin embargo, el tamaño de los anticuerpos y la complejidad de seis bucles representa un obstáculo principal para el diseño si el resultado final ha de ser un ligando del péptido relativamente pequeño.

30 *Subestructuras del anticuerpo*

Las subestructuras funcionales de los Ab pueden prepararse por proteólisis y por procedimientos recombinantes. Incluyen el fragmento Fab, que comprende los dominios VH-CH1 de la cadena pesada y los dominios VL-CL1 de
35 la cadena ligera unidos por un solo enlace disulfuro entre las cadenas, y el fragmento Fv, que comprende solamente los dominios VH y VL. En algunos casos, un solo dominio VH conserva afinidad significativa (Ward *et al.*, 1989). Se ha demostrado también que una determinada cadena ligera monomérica κ se unirá específicamente a su antígeno afín. (L. Masat *et al.*, 1994). Se ha descubierto que algunas veces las cadenas ligera o pesada por separado conservan alguna actividad de fijación al antígeno (Ward *et al.*, 1989). Estos fragmentos de anticuerpo no son adecuados para
40 el análisis estructural utilizando espectroscopia RMN debido a su tamaño, baja solubilidad o baja estabilidad de la configuración.

Otra subestructura funcional es una cadena individual Fv (scFv), compuesta por las zonas variables de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina, conectada por enlace covalente mediante un enlazador peptídico (S-z Hu *et al.*,
45 1996). Estas pequeñas proteínas (M_r 25.000) generalmente conservan especificidad y afinidad para el antígeno en un solo polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas mayores específicas para el antígeno. Varios grupos han publicado estudios de biodistribución en ratones lampiños xenoinjertados utilizando el scFv reactivo contra una mayoría de antígenos tumorales, en los que se ha observado localización específica del tumor. Sin embargo, la corta persistencia de los scFv en la circulación limita la exposición de las células tumorales a
50 los scFv, limitando el nivel de absorción. Como resultado, la absorción tumoral por los scFv en estudios animales ha sido generalmente solo del 1 al 5% de ID/g en oposición a los anticuerpos intactos que pueden localizarse en tumores del 30 al 40% de ID/g y han alcanzado concentraciones tan altas como del 60 al 70% de ID/g.

Se diseñó un andamio para proteína pequeña denominado “minicuerpo” utilizando una parte del dominio VH de Ig como plantilla (Pessi *et al.*, 1993). Los minicuerpos con gran afinidad (constante de disociación (K_d) $\sim 10^{-7}$
55 M) para la interleucina-6 fueron identificados por bucles aleatorios que corresponden a CDR1 y CDR2 de VH y a continuación seleccionando mutantes utilizando el procedimiento de expresión en el fago (Martin *et al.*, 1994). Estos experimentos demostraron que la esencia de la función de Ab podría transferirse a un sistema más pequeño. Sin embargo, el minicuerpo ha heredado la solubilidad limitada del dominio VH (Bianchi *et al.*, 1994).

Se ha publicado que los camellos (*Camelus dromedarius*) con frecuencia carecen de los dominios variables de la cadena ligera cuando se analiza el material de su suero análogo a IgG, sugiriendo que una especificidad y afinidad
60 suficiente del anticuerpo puede proceder de los dominios VH (tres bucles CDR) solos. Davies y Riechmann demostraron recientemente que los dominios VH “camellizados” con gran afinidad ($K_d \sim 10^{-7}$ M) y gran especificidad pueden generar al azar solamente el CDR3. Para mejorar la solubilidad y suprimir la fijación no específica, se introdujeron tres mutaciones de la zona del armazón (Davies y Riechmann, 1995). No se ha demostrado definitivamente, sin embargo, que pueda utilizarse la camellización, en general, para mejorar la solubilidad y estabilidad de las VH.

ES 2 301 198 T3

Una alternativa al “minicuerpo” es el “diacuerpo”. Los diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpo bivalentes y biospecíficos, es decir, tienen dos puntos de fijación al antígeno. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado al dominio variable con cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Los diacuerpos son de tamaño similar al de un fragmento Fab. Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios de la misma cadena, los dominios están forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos puntos de fijación al antígeno. Los fragmentos diméricos del anticuerpo, o “diacuerpos”, son bivalentes y biospecíficos. P. Holliger *et al.*, *PNAS* 90:6444-6448 (1993).

Desde el desarrollo de la tecnología del anticuerpo monoclonal, un gran número de estructuras 3D de los fragmentos Ab en los estados acomplejado y/o libre se ha resuelto por cristalografía de rayos X (Webster *et al.*, 1994; Wilson y Stanfield, 1994). El análisis de las estructuras Ab ha puesto de manifiesto que cinco de cada seis CDR presentan números limitados de configuraciones del eje central peptídico, permitiendo por ello predecir la configuración del eje central de los CDR utilizando las estructuras denominadas canónicas (Lesk y Tramontano, 1992; Rees *et al.*, 1994). El análisis ha puesto de manifiesto asimismo que el CDR3 del dominio VH (VH-CDR3) habitualmente tiene la superficie de contacto mayor y que su conformación es demasiado diversa para definir las estructuras canónicas; VH-CDR3 es también conocido por tener una gran variación en su longitud (Wu *et al.*, 1993). Por consiguiente, las estructuras de las zonas cruciales de la interfase Ab-antígeno necesitan todavía ser determinadas experimentalmente.

La comparación de las estructuras cristalinas entre los estados libre y acomplejado ha puesto de manifiesto varios tipos de transposiciones de la configuración. Incluyen transposiciones de la cadena lateral, movimientos de los segmentos, transposiciones grandes de VH-CDR3 y cambios en la posición relativa de los dominios VH y VL (Wilson y Stanfield, 1993). En estado libre, las CDR, en particular aquellas que experimentan grandes cambios de configuración en la fijación, es de esperar que sean flexibles. Dado que no se aconseja la cristalografía de rayos X para las partes características flexibles de las moléculas, los estudios estructurales en estado de solución no han hecho posible el proporcionar fotografías dinámicas de la configuración de los puntos de fijación al antígeno.

Simulación del punto de fijación al anticuerpo

Se han preparado (Dougall *et al.*, 1994) péptidos de la CDR y simulaciones orgánicas de la CDR. Los péptidos de la CDR son cortos, por lo general cíclicos, péptidos que corresponden a las secuencias de aminoácidos de los bucles de CDR de anticuerpos. Los bucles de la CDR son responsables de interacciones anticuerpo-antígeno. Las simulaciones orgánicas de la CDR son péptidos que corresponden a los bucles de la CDR que están unidos a un andamio, p. ej., un pequeño compuesto orgánico.

Se ha demostrado que los péptidos de la CDR y las simulaciones orgánicas de la CDR conservan alguna afinidad de fijación (Smyth y von Itzstein, 1994). Sin embargo, como era de esperar, son demasiado pequeños y demasiado flexibles para mantener la afinidad y especificidad totales. Las CDR de ratón se han injertado en el armazón de Ig humana sin pérdida de afinidad (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988), aunque esta “humanización”, no resuelve los problemas específicos mencionados anteriormente para los estudios en solución.

Procedimientos de simulación de la selección natural de los Ab

En el sistema inmunitario, los Ab específicos se seleccionan y amplían a partir de un banco grande (maduración por afinidad). Los procedimientos pueden reproducirse *in vitro* utilizando tecnologías de banco combinatorio. La expresión con éxito de los fragmentos de Ab en la superficie del bacteriófago ha hecho posible generar e identificar un extenso número de mutaciones de CDR (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Winter *et al.*, 1994). Un número creciente de Fab y Fvs (y sus derivados) es producido por esta técnica, lo que proporciona una fuente rica para estudios estructurales. La técnica combinatoria puede combinarse con simulaciones de Ab.

Numerosos dominios de proteína que podrían servir en potencia como andamios proteicos se han expresado como fusiones con las proteínas de la cápside del fago. Véase Clackson y Wells, *Trends Biotechnol.* 12:173-184 (1994). De hecho, varios de estos dominios de proteína se han utilizado ya como andamios para desplegar secuencias peptídicas aleatorias, incluyendo el inhibidor de tripsina pancreática bovina (Roberts *et al.*, *PNAS* 89:2429-2433 (1992)), la hormona de crecimiento humana (Lowman *et al.*, *Biochemistry* 30:10832-10838 (1991)), Venturini *et al.*, *Protein Peptide Letters* 1:70-75 (1994)) y el dominio de fijación a IgG de *Streptococcus* (O’Neil *et al.*, *Techniques in Protein Chemistry V* (Crabb, L., ed.) págs. 517-524, Academic Press, San Diego (1994)). Estos andamios han desplegado un solo bucle o zona aleatoria.

Los investigadores han utilizado el pequeño inhibidor de α -amilasa de 74 amino-ácidos, Tendamistat como un andamio de expresión en el fago filamentoso M13 (McConnell y Hoess, 1995). Tendamistat es una proteína en lámina β procedente de *Streptomyces tendae*. Hay numerosas propiedades que le hacen ser un andamio atractivo para péptidos, incluyendo su pequeño tamaño, estabilidad y la disponibilidad de datos de la estructura por RMN de alta resolución y por rayos X. La configuración general de Tendamistat es similar a la de un dominio de inmunoglobulina, con dos hojas β conectadas por una serie de bucles. En contraste con los dominios de inmunoglobulina, las láminas β de Tendamistat se mantienen juntas con dos mejor que con un enlace disulfuro, teniendo en cuenta la considerable estabilidad de la proteína. Por analogía con los bucles CDR encontrados en las inmunoglobulinas, los bucles de Tendamistat pueden servir una función similar y pueden ser fácilmente aleatorizados por mutagénesis *in vitro*.

Sin embargo Tendamistat, procede de *Streptomyces tendae*. De este modo, mientras que Tendamistat puede ser antigénico en humanos, su pequeño tamaño puede reducir o inhibir su antigenicidad. Asimismo, la estabilidad de Tendamistat es dudosa. Además, la estabilidad que está publicada para Tendamistat se atribuye a la presencia de dos enlaces disulfuro. Los enlaces disulfuro, sin embargo, son un inconveniente significativo para dichas moléculas en las que pueden romperse en condiciones reductoras y debe formarse propiamente con objeto de obtener una estructura proteica útil. Además, los tamaños se forman propiamente con objeto de tener una estructura proteica útil. Además, los tamaños de los bucles en Tendamistat son relativamente pequeños, limitando de este modo el tamaño de las inserciones que pueden acomodarse en el andamio. Además, es bien conocido que formar enlaces disulfuro correctos en péptidos recién sintetizados no es fácil. Cuando se expresa una proteína en el espacio citoplásmico de *E. coli*, bacteria hospedadora más frecuente para la sobreexpresión de la proteína, los enlaces disulfuro no se forman habitualmente, dificultando potencialmente el preparar grandes cantidades de moléculas modificadas genéticamente.

Por lo tanto, existe una necesidad activa, de pequeños anticuerpos artificiales monocatenarios para una mayoría de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y catalíticas.

Ely K. *et al.*, (1995) *Protein Engineering* 8(8): 823-827 da a conocer un andamio molecular común para dos moléculas de RGD no relacionadas. Una de las proteínas que contiene la señal de RGD es la molécula de tipo III de fijación a la célula de fibronectina (FNIII₁₀).

Le G *et al.*, (1993) *Protein Engineering* 6(7): 745-754 describe la instalación de secuencias de RGD en los “andamios de expresión”, es decir, el dominio REI de V_L de inmunoglobulina y la interleucina - 1 β humana.

Sumario de la invención

La invención proporciona un monocuerpo de polipéptido de fibronectina tipo III (Fn3), que comprende una mayoría de secuencias de dominio Fn3 con cadena β que están unidas a una mayoría de secuencias de la zona del bucle, en el que una o más de las secuencias de la zona del bucle del monocuerpo varían por eliminación, inserción o sustitución de por lo menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias de la zona del bucle correspondientes en Fn3 natural, y es capaz de unirse a un acompañante de fijación específica (SBP) para formar un complejo péptido:SBP o un compuesto análogo del estado de transición (TSAC).

Preferentemente, una o más de las zonas bucle del monocuerpo comprenden restos de aminoácidos:

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

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un monocuerpo polipeptídico de Fn3 de la invención, así como un vector de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico y una célula hospedadora que comprende dicho vector.

La invención proporciona además un procedimiento de preparación de un monocuerpo polipeptídico de Fn3. El procedimiento comprende proporcionar una secuencia de ADN que codifica unas secuencias de la zona, en la que por lo menos una zona del bucle de dicha secuencia contiene un único punto de la enzima de restricción. La secuencia de ADN se escinde en el único punto de restricción. A continuación se inserta un segmento de ADN preseleccionado en el punto de restricción. El segmento de ADN preseleccionado codifica un péptido capaz de unirse a un acompañante de fijación específica (SBP) o a un compuesto análogo del estado de transición (TSAC). La inserción del segmento de ADN preseleccionado en la secuencia de ADN proporciona una molécula de ADN que codifica un monocuerpo polipeptídico con una inserción. La molécula de ADN se expresa a continuación para proporcionar el monocuerpo polipeptídico.

Se proporciona asimismo un procedimiento de preparación de un anticuerpo polipeptídico de Fn3, procedimiento que comprende proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una mayoría de secuencias de dominio de la cadena β de Fn3 que están unidas a una mayoría de secuencias de la zona del bucle, en las que la secuencia nucleotídica de por lo menos una zona del bucle es conocida. Se proporcionan o se preparan cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que son suficientemente complementarios con la secuencia bucle conocida a fin de que sean hibridables en las condiciones de la PCR, en las que por lo menos uno de los cebadores contiene una secuencia de ácido nucleico modificada que ha de insertarse en la secuencia de ADN. La PCR se realiza utilizando una secuencia de ADN replicable y los cebadores. El producto de reacción de la PCR se expresa a continuación a fin de proporcionar un monocuerpo polipeptídico.

ES 2 301 198 T3

La invención proporciona además un procedimiento de preparación de un monocuerpo polipeptídico de Fn3. El procedimiento comprende proporcionar una secuencia replicable de ADN que codifica una mayoría de secuencias de dominio de la Fn3 de doble cadena que están unidas a una mayoría de secuencias de la zona del bucle, en la que la secuencia nucleotídica de por lo menos una zona del bucle es conocida. Se realiza la mutagénesis dirigida al punto de por lo menos una zona del bucle a fin de crear la mutación de inserción. El ADN resultante que comprende la mutación de la inserción se expresa a continuación.

Se proporciona además un banco variegado de ácidos nucleicos que codifica los monocuerpos polipeptídicos de Fn3 que comprende una mayoría de especies de ácido nucleico que codifican una mayoría de secuencias del dominio de Fn3 con cadena β que están unidas a una mayoría de secuencias de la zona del bucle, en la que una o más de las secuencias del anticuerpo de la zona del bucle varían por eliminación, inserción o sustitución de por lo menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias correspondientes de la zona del bucle en Fn3 natural, y en las que los dominios de cadena β del monocuerpo tienen por lo menos un 50% de homología de la secuencia total de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la secuencia del dominio de cadena β del Fn3 natural. La invención proporciona también un banco de expresión en el péptido procedente del banco variegado de ácidos nucleicos de la invención. Preferentemente, el péptido del banco de expresión en el péptido se expresa en la superficie de un bacteriófago, p. ej., un bacteriófago M13 o un bacteriófago fd o un virus.

La invención proporciona también un procedimiento de identificación de la secuencia de aminoácidos de una molécula polipeptídica capaz de unirse a un acompañante de fijación específica (SBP) a fin de formar un complejo polipéptido:SBP, en el que la constante de disociación de dicho complejo polipéptido:SBP es inferior a 10^{-6} moles/litro. El procedimiento comprende las etapas siguientes:

a) proporcionar un banco de expresión en péptidos de la invención;

b) poner en contacto el banco de expresión en péptidos de (a) con un SBP inmovilizado o separable;

c) separar los complejos péptido:SBP de los péptidos libres;

d) producir la replicación de los péptidos separados de (c) a fin de que produzca un nuevo banco de expresión en el péptido que se distingue de éste en (a) por tener una menor diversidad y por estar enriquecida en los péptidos expresados capaces de unirse al SBP;

e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c) y (d) con el nuevo banco de (d); y

f) determinar la secuencia de ácidos nucleicos de la zona que codifica el péptido expresado de una especie procedente de (d) y deducir, por consiguiente, la secuencia peptídica capaz de unirse al SBP.

La presente invención proporciona también un procedimiento de preparación de un banco variegado de ácido nucleico que codifica los monocuerpos polipeptídicos Fn3 que tienen una mayoría de especies de ácido nucleico que comprende cada una mayoría de zonas del bucle, en la que la especie codifica una mayoría de secuencias de dominio Fn3 con cadena beta que están unidas a una mayoría de secuencias de la zona del bucle, en la que una o más de las secuencias de la zona del bucle varían por eliminación, inserción o sustitución de por lo menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias de la zona del bucle correspondientes en Fn3 natural, y en la que las secuencias de dominio con cadena β del monocuerpo tienen por lo menos el 50% de homología de secuencia total de aminoácidos con las correspondientes secuencias de aminoácidos de las secuencias de dominio de la cadena β del Fn3 natural que comprende las etapas siguientes:

a) preparar un monocuerpo polipeptídico de Fn3 que tiene una secuencia predeterminada;

b) poner en contacto el polipéptido con un acompañante de fijación específico (SBP) para formar un complejo polipéptido:SBP en el que la constante de disociación de dicho complejo polipéptido:SBP es inferior a 10^{-6} moles/litro;

c) determinar la estructura de fijación del complejo polipéptido:SBP por espectroscopia de resonancia magnética nuclear o por cristalografía de rayos X; y

d) preparar el banco de ácidos nucleicos variegado, en el que la variegación se realiza en las posiciones en la secuencia de ácido nucleico que, a partir de la información proporcionada en (c), produce uno o más polipéptidos que mejoran la fijación al SBP.

Se proporciona también un procedimiento de identificación de la secuencia de aminoácidos de una molécula de polipéptido capaz de catalizar una reacción química con una constante de la proporción catalizada, k_{cat} , y una constante de la proporción no catalizada, k_{uncat} , de tal modo que la relación k_{cat}/k_{uncat} es mayor de 10. El procedimiento comprende las etapas siguientes:

a) proporcionar un banco de expresión en péptidos de la invención;

ES 2 301 198 T3

b) poner en contacto el banco de expresión en péptidos de (a) con un compuesto análogo del estado de transición (TSAC) inmovilizado o separable que representa el estado de transición molecular aproximado de la reacción química;

c) separar los complejos péptido:TSAC de los péptidos libres;

d) producir la replicación de los péptidos separados de (c) a fin de producir un nuevo banco de expresión en péptidos que se distingue del de (a) por tener una menor diversidad y por estar enriquecido en péptidos expresados capaces de unirse al TSAC;

e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c) y (d) con el nuevo banco de (d); y

f) determinar la secuencia de ácidos nucleicos de la zona que codifica el péptido expresado de una especie de (d) y por consiguiente deducir la secuencia peptídica.

La invención proporciona también un procedimiento de preparación de un banco variegado de ácidos nucleicos que codifica los monocuerpos polipeptídicos de Fn3 que tienen una mayoría de especies de ácido nucleico que comprende cada una mayoría de las zonas del bucle, en la que la especie codifica una mayoría de secuencias de dominio Fn3 con cadena β que están unidas a una mayoría de secuencias de la zona del bucle, en la que una o más de las secuencias de la zona del bucle varían por eliminación, inserción o sustitución de por lo menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias de la zona del bucle correspondientes en Fn3 natural, y en la que las secuencias de dominio con cadena β del monocuerpo tienen por lo menos el 50% de homología de secuencia total de aminoácidos con las correspondientes secuencias de aminoácidos de las secuencias de dominio de la cadena β del Fn3 natural que comprende las etapas siguientes:

a) preparar un monocuerpo polipeptídico de Fn3 que tiene una secuencia predeterminada, en el que el polipéptido es capaz de catalizar una reacción química con una constante de la proporción catalizada, k_{cat} , y una constante de la proporción no catalizada, k_{uncat} , de tal modo que la relación k_{cat}/k_{uncat} es mayor de 10;

b) poner en contacto el polipéptido con un compuesto análogo del estado de transición (TSAC) inmovilizado o separable que representa el estado de transición molecular aproximado de la reacción química;

c) determinar la estructura de fijación del complejo polipéptido:TSAC por espectroscopia de resonancia magnética nuclear o por cristalografía de rayos X; y

d) preparar el banco de ácidos nucleicos variegado, en el que la variegación se realiza en las posiciones en la secuencia de ácido nucleico que, a partir de la información proporcionada en (c), produce uno o más polipéptidos que mejoran la fijación al TSAC o la estabilización del mismo.

La invención proporciona asimismo un kit para la realización de cualquiera de los procedimientos de la invención. La invención proporciona además una composición, por ejemplo, un polipéptido, preparado para la utilización del kit, o identificado por alguno de los procedimientos de la invención.

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

Para describir los ácidos nucleicos ADN o ARN, se han utilizado las abreviaturas siguientes: A, adenosina; T, timidina; G, guanosina; C, citosina.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Configuración de la cadena β y del bucle (A, B) y representación MOLSCRIPT (C, D; Kraulis, 1991) del dominio VH de anti-lisozima inmunoglobulina D1.3 (A, C; Bhat *et al.*, 1994) y el 10° dominio tipo III de la fibronectina humana (B, D; Main *et al.*, 1992). Se indican las posiciones de las zonas determinantes de complementariedad (zonas hipervariables de las CDR) y la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) de fijación a la integrina.

Figura 2. Secuencia de aminoácidos (SEC. ID. n°: 110) y secuencias de restricción del gen de sintético Fn3. La numeración del resto es según Main *et al.* (1992). Las secuencias diseñadas de la enzima de restricción se presentan encima de la secuencia de aminoácidos. Las cadenas β están subrayadas. La secuencia "mq" N-terminal se ha añadido para una clonación ulterior en un vector de expresión. La proteína de fusión His-tag (Novagen) tiene una secuencia adicional, MGSSHHHHHSSGLVPRGSH, (SEC. ID. n°: 114) que precede a la secuencia Fn3 mostrada anteriormente.

Figura 3. A, espectro CD UV lejano de Fn3 natural a 25°C y 90°C. Se disolvió Fn3 (50 μ M) en acetato sódico (50 mM, pH 4,6). B, desnaturalización térmica de Fn3 controlada a 215 nm. Se aumentó la temperatura a un ritmo de 1°C/min.

ES 2 301 198 T3

Figura 4. A, trazas en $C\alpha$ de la estructura cristalina del complejo de lisozima (HEL) y el fragmento Fv de anticuerpo D1.3 anti-lisozima de clara de huevo de gallina (anti-HEL) (Bhat *et al.*, 1994). Se muestran también las cadenas laterales de los restos 99 a 102 de VH CDR3, que contactan con HEL. B, área de la superficie de contacto de cada resto de las interacciones VH-HEL y VH-VL de D1.3 representadas frente al número de resto de VH de D1.3. El área superficial y la estructura secundaria se determinaron utilizando el programa DSSP (Kabsh y Sander, 1983). C y D, dibujos esquemáticos de la estructura de la lámina β de los restos cadena F-bucle-cadena G de VH de D1.3 (C) y de Fn3 (D). Los rectángulos indican restos en las cadenas β y los óvalos los que no están en las cadenas. Los rectángulos sombreados indican los restos cuyas cadenas laterales están significativamente ocultas. Las líneas de puntos indican los enlaces de hidrógeno.

Figura 5. Gen diseñado de Fn3 que presenta las secuencias de ADN y de aminoácidos (SEC. ID. n°: 111 y SEC. ID. n°: 112, respectivamente). La numeración de aminoácidos es según Main *et al.* (1992). Los dos bucles que están al azar en los bancos combinatorios están encerrados en rectángulos.

Figura 6. Cartografía del plásmido pAS45. El plásmido pAS45 es el vector de expresión de His-tag-Fn3.

Figura 7. Cartografía del plásmido pAS25. El plásmido pAS25 es el vector de expresión de Fn3.

Figura 8. Cartografía del plásmido pAS38. El plásmido pAS38 es el vector fagómico para la presentación en la superficie de Fn3.

Figura 9. (Ubiquitina-1) Caracterización de la fijación específica para el ligando de clones enriquecidos utilizando el ensayo inmunosorbente con enzima ligada (ELISA) del fago. Se recubrieron los pocillos de la placa de microvaloración con ubiquitina (1 $\mu\text{g/pocillo}$; ligando (+)) y a continuación se bloquearon con BSA. La solución de fago en TBS que contenía aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de colonias (cfu) se añadieron a un pocillo y se lavaron con TBS. Los fagos ligados se detectaron con conjugado anticuerpo-POD anti-fago (Farmacia) con Turbo-TMB (Pierce) como sustrato. Se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro de microplaca SPECTRAMax 250 de Molecular Devices. Como referencia, se utilizaron pocillos sin ligando inmovilizado. 2-1 y 2-2 indican clones enriquecidos del banco 2 eluidos con ligando libre y ácido, respectivamente. 4-1 y 4-2 indican clones del banco 4 eluidos con ligando libre y ácido, respectivamente.

Figura 10. (Ubiquitina-2) ELISA de competencia con fago de clones enriquecidos. Las soluciones de fago que contienen aproximadamente 10^{10} cfu se incubaron en primer lugar con ubiquitina libre a 4°C durante 1 hora antes de la fijación del pocillo recubierto con ligando. Se lavaron los pocillos y se detectaron los fagos como se ha descrito anteriormente.

Figura 11. ELISA de competencia con fago del monocuerpo 411 de fijación a ubiquitina. Las condiciones experimentales son las mismas que las descritas anteriormente para la ubiquitina. Se realizó el ELISA en presencia de ubiquitina libre en la solución de fijación. Los experimentos se realizaron con cuatro preparaciones diferentes del mismo clon.

Figura 12. ELISA con fago (fluoresceína-1) de cuatro clones, pLB25.1 (que contiene la SEC. ID. n°: 115), pLB25.4 (que contiene la SEC. ID. n°: 116), pLB24.1 (que contiene la SEC. ID. n°: 117) y pLB24.3 (que contiene la SEC. ID. n°: 118). Las condiciones experimentales son las mismas que para la ubiquitina-1, anteriormente.

Figura 13. ELISA de competencia (fluoresceína-2) de los cuatro clones. Las condiciones experimentales son las mismas que para la ubiquitina-2, anteriormente.

Figura 14. Espectro HSQC de ^1H y ^{15}N de un monocuerpo LB25.5 con fijación por fluorescencia. Se disolvió una proteína aproximadamente $20 \mu\text{M}$ en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 5,0) que contenía cloruro sódico 100 mM . Se recogió el espectro a 30°C en un espectrómetro INOVA 600 NMR de Varian Unity.

Figura 15. Caracterización de la reacción de fijación de Ubi4-Fn3 a la diana, ubiquitina.

(a) Análisis ELISA con fago de la fijación de Ubi4-Fn3 a ubiquitina. Se midió la fijación de Ubi4-fagos a los pocillos recubiertos con ubiquitina. Se realizó el experimento de control con los pocillos que no contienen ubiquitina.

(b) ELISA de competencia con fago de Ubi4-Fn3. Se preincubaron fagos de Ubi4-Fn3 con ubiquitina soluble a una concentración indicada, seguido de la detección por ELISA en el fago en los pocillos recubiertos con ubiquitina.

(c) ELISA de competencia con fago que prueba la especificidad del clon Ubi4. Se preincubaron fagos de Ubi4 con $250 \mu\text{g/ml}$ de proteínas solubles, seguido del ELISA con fago como en (b)

(d) ELISA utilizando proteínas libres.

Figura 16. Curvas de equilibrio desplegadas para Ubi4-Fn3 (símbolos en negro) y Fn3 natural (símbolos en blanco). Los cuadrados indican los datos medidos en TBS (tampón Tris HCl (50 mM , pH 7,5) que contiene NaCl (150 mM)). Los círculos indican los datos medidos en tampón Gly HCl (20 mM , pH 3,3) que contiene NaCl (300 mM). Las

curvas presentan el mejor ajuste de la curva de transición basado en el modelo de dos estados. Los parámetros que caracterizan las transiciones están listados en la Tabla 7.

Figura 17. (a) Espectro ^1H , ^{15}N -HSQC de [^{15}N]-Ubi4-K Fn3. (b). Diferencia ($\delta_{\text{natural}} - \delta_{\text{Ubi4}}$) de ^1H (b) y ^{15}N (c) desplazamientos químicos representados frente al número de resto. Valores de los restos 82 a 84 (mostrados como círculos negros) en los que las delecciones de Ubi4-K están fijadas en cero. Los círculos blancos indican restos que están mutados en la proteína Ubi4-K. Las posiciones de las cadenas β están indicadas con flechas.

Descripción detallada de la invención

Durante la pasada década, el sistema inmunitario ha sido explotado como una fuente rica de catalizadores *de novo*. Se ha demostrado que los anticuerpos catalíticos presentan quimioselectividad, enantioselectividad, grandes aceleraciones de velocidad e incluso una capacidad para reconducir las reacciones químicas. En la mayoría de los casos se han producido anticuerpos contra haptenos análogos del estado de transición (TSA). Estos haptenos TSA son compuestos estables de bajo peso molecular diseñados para imitar las estructuras de las especies del estado de transición energéticamente inestables que aparecen brevemente (aproximadamente 10^{-13} s de vida media) a lo largo de la serie de reacciones entre los reactivos y los productos. Se cree que los anticuerpos anti-TSA, similares a las enzimas naturales, se unen selectivamente y estabilizan el estado de transición, facilitando con ello el paso de los reactivos a productos. De este modo, en el momento de la fijación, el anticuerpo reduce la energía del estado de transición existente y aumenta la velocidad de reacción. Estos catalizadores pueden programarse para unirse a las características geométricas y electrostáticas del estado de transición de modo que la vía de reacción puede controlarse neutralizando cambios desfavorables, superando las barreras entrópicas e imponiendo las características estereoelectrónicas de la reacción. Mediante estos medios incluso las reacciones que de otro modo estarían muy desfavorecidas han sido catalizadas (Janda *et al.* 1997). Además, en muchos casos se han preparado catalizadores para las reacciones para las que no existen enzimas naturales o sintéticas.

El éxito de cualquier sistema químico combinatorio en la obtención de una función determinada depende del tamaño del banco y de la capacidad para acceder a sus miembros. Muy a menudo los anticuerpos que se preparan en un animal contra un hapteno que imita el estado de transición de una reacción se identifican en primer lugar por la unión al hapteno y a continuación se identifican de nuevo por la capacidad catalítica. Un procedimiento mejorado permite la selección directa para la catálisis a partir de bancos de anticuerpos en el fago, interconectando de este modo química y replicación.

Puede crearse un banco de fragmentos de anticuerpo en la superficie de los virus de fago filamentoso añadiendo genes de anticuerpo al azar al gen que codifica la proteína recubierta de fago. Cada fago se expresa a continuación y presenta muchas copias de un solo fragmento de anticuerpo en su superficie. Debido a que cada fago posee tanto el fragmento de anticuerpo expresado en superficie como el ADN que codifica este fragmento, y el fragmento de anticuerpo que se une a una diana puede identificarse ampliando el ADN asociado.

Los inmunoquímicos utilizan como materiales antígenos que tengan reactividad química tan pequeña como sea posible. Casi siempre se da el caso de que se desea el último anticuerpo para interactuar con las estructuras naturales. En inmunización reactiva el concepto es justo el contrario. Se inmuniza con compuestos que son muy reactivos de modo que en el momento de la fijación a la molécula de anticuerpo durante el proceso de inducción, se efectúa una reacción química. Después esta misma reacción química forma parte del mecanismo del episodio catalítico. En determinado sentido se está inmunizando con una reacción química en lugar de una sustancia *per se*. Los inmunoógenos reactivos pueden considerarse como análogos para los inhibidores basados en el mecanismo que utilizan los enzimólogos excepto que se utilizan de manera inversa a éste, en lugar de inhibir un mecanismo, producen un mecanismo.

Los anticuerpos catalíticos artificiales presentan un considerable potencial comercial en muchas aplicaciones diferentes. Los productos a base de anticuerpo catalítico se han utilizado con éxito en experimentos prototipo en aplicaciones terapéuticas, tales como la activación de profármacos y la inactivación de cocaína y en aplicaciones no terapéuticas tales como en biodetectores y en síntesis orgánica.

Los anticuerpos catalíticos son teóricamente más atractivos que los anticuerpos no catalíticos como agentes terapéuticos porque, al ser catalíticos, pueden utilizarse en dosis más bajas, y también porque sus efectos son excepcionalmente irreversibles (por ejemplo, la escisión del enlace peptídico en lugar de la fijación). En terapia, pueden administrarse directamente a un paciente anticuerpos catalíticos purificados, o alternativamente la respuesta catalítica del anticuerpo del propio paciente podría provocarse por inmunización con un hapteno apropiado. También podrían utilizarse anticuerpos catalíticos como herramientas de diagnóstico clínico o como catalizadores regioselectivos o estereoselectivos en la síntesis de productos químicos finos.

I. Mutación de bucles de Fn3 e injerto de bucles de Ab en Fn3

Un andamio ideal para injertar CDR es muy soluble y estable. Es lo suficientemente pequeño para el análisis estructural, pero lo suficientemente grande acomodar múltiples CDR a fin de conseguir una unión íntima y/o alta especificidad.

Se desarrolló una nueva estrategia para generar un sistema de Ab artificial en el armazón de una proteína no de Ab existente. Una ventaja de esta estrategia sobre la minimización de un andamio de Ab es que se puede evitar heredar las propiedades no deseadas de los Ab. Se utilizó como andamio el dominio de fibronectina tipo III (Fn3). La fibronectina es una proteína grande que desempeña funciones esenciales en la formación de la matriz extracelular y en las interacciones célula a célula; consta de muchas repeticiones de tres tipos (I, II y III) de pequeños dominios (Baron *et al.*, 1991). La propia Fn3 es el paradigma de una gran subfamilia (familia Fn3 o familia Ig tipo s) de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). La familia Fn3 incluye moléculas de adhesión celular, hormonas de la superficie celular y receptores de citocina, chaperoninas y dominios de fijación a carbohidratos (para estudios, véase Bork y Doolittle, 1992; Jones, 1993; Bork *et al.*, 1994; Campbell y Spitzfaden, 1994; Harpez y Chothia, 1994).

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

Fn3 es monomérica pequeña (~95 restos), soluble y estable. Es uno de los pocos miembros de la IgSF que no tienen enlaces disulfuro; VH tiene un enlace disulfuro dentro de la cadena (Fig. 1 A) y tiene ligera estabilidad en condiciones reductoras. Fn3 se ha expresado en *E. coli* (Aukhil *et al.*, 1993). Además, los dominios 17 de Fn3 están presentes solo en la fibronectina humana, proporcionando información importante sobre los restos conservados que con frecuencia son importantes para la estabilidad y el plegamiento (para la alineación de la secuencia, véase Main *et al.*, 1992 y Dickinson *et al.*, 1994). A partir del análisis de la secuencia, se observan grandes variaciones en los bucles BC y FG, lo que sugiere que los bucles no son cruciales para la estabilidad. Los estudios por RMN han puesto de manifiesto que el bucle FG es muy flexible; la flexibilidad ha estado implicada en la fijación específica de la 10^a Fn3 para la integrina $\alpha_5\beta_1$ en todo el motivo Arg-Gly-Asp (RGD) (SEC. ID. n^o: 113). En la estructura cristalina del complejo hormona de crecimiento humano-receptor (de Vos *et al.*, 1992), el segundo dominio de Fn3 del receptor interactúa con la hormona a través de los bucles FG y BC, lo que sugiere que es viable construir una secuencia de fijación utilizando los dos bucles.

El décimo módulo de tipo III de fibronectina tiene un pliegue similar al de los dominios de inmunoglobulina, con siete cadenas β que forman dos láminas β antiparalelas, que se envuelven una en la otra (Main *et al.*, 1992). La estructura del módulo de tipo II de siete cadenas β , que forman un sándwich de dos láminas β antiparalelas, una que contiene tres cadenas (ABE) y la otra cuatro cadenas (C'CFG) (Williams *et al.*, 1988). La lámina β de triple cadena consta de los restos Glu-9-Thr-14 (A), Ser-17-Asp-23 (B) y Thr-56-Ser-60 (E). La mayoría de los restos conservados contribuyen al núcleo hidrófobo, con los restos hidrófobos invariantes Trp-22 y Try-68 que están situados hacia los extremos N-terminal y C-terminal del núcleo, respectivamente. Las cadenas β son mucho menos flexibles y parece que proporcionan un armazón rígido en el que se construyen bucles funcionales y flexibles. La configuración es similar a la de los dominios de la inmunoglobulina C.

Construcción génica y mutagénesis

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

Se montó el gen de la manera siguiente: (1) se dividió la secuencia del gen en cinco partes con límites en las secuencias de restricción diseñadas (Fig. 2); (2) en cada parte, se sintetizó un par de oligonucleótidos que codifica cadenas opuestas y que tiene solapamientos complementarios de ~15 bases; (3) se hibridaron los dos oligonucleótidos y se completaron las zonas monocatenarias utilizando el fragmento de Klenow de ADN polimerasa; (4) se clonó el oligonucleótido bicatenario en el vector pET3a (Novagen) utilizando las secuencias de la enzima de restricción en los terminales del fragmento y se confirmó su secuencia con un secuenciador de ADN de Applied Biosystems utilizando el protocolo de terminación dideoxi proporcionado por el fabricante; (5) se repitieron las etapas 2 a 4 para obtener el gen completo (plásmido pAS25) (Fig. 7).

Aunque el presente procedimiento tarda más en montar un gen que el procedimiento de reacción en cadena de polimerasa (PCR) de una etapa (Sandhu *et al.*, 1992), no se produjo ninguna mutación en el gen. Las mutaciones probablemente habrían sido introducidas por la replicación de baja fidelidad por la Taq polimerasa y habrían requerido edición génica que emplea mucho tiempo. El gen se clonó también en el vector pET15b (Novagen) (pEW1). Ambos vectores expresaron el gen para Fn3 bajo el control del activador T7 del bacteriófago (Studler *et al.* 1990); pAS25 expresó la proteína Fn3 de 96 restos solamente, aunque pEW1 expresó a Fn3 como una proteína de fusión con el péptido poli-histidina (His-tag). Se llevaron a cabo manipulaciones del ADN recombinante según Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989), a menos que se indique de otro modo.

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

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

Se identificaron dos bucles experimentales (FG y BC) para injerto. Se examinaron anticuerpos con estructuras cristalinas conocidas con objeto de identificar candidatos para que las fuentes de bucles se injertan en Fn3. Se seleccionó anticuerpo D1.3 de anti-lisozima de huevo de gallina (HEL) (Bhat *et al.*, 1994) como fuente de un bucle de la CDR. Las razones para esta selección fueron: (1) están disponibles las estructuras cristalinas de alta resolución de los estados libre y acomplejado (Fig. 4 A; Bhat *et al.*, 1994), (2) están disponibles los datos termodinámicos para la reacción de fijación (Tello *et al.*, 1993), (3) se ha utilizado D1.3 como paradigma para el análisis estructural del Ab y la modificación genética de Ab (Verhoeyen *et al.*, 1988; McCafferty *et al.*, 1990) (4) los experimentos de mutagénesis dirigida a la secuencia han demostrado que CDR3 de la cadena pesada (VH-CDR3) contribuyen en mayor medida a la afinidad que las demás CDR (Hawkins *et al.*, 1993), y (5) puede realizarse fácilmente un ensayo de fijación. El objetivo de esta prueba fue injertar VH-CDR3 de D1.3 en el andamio de Fn3 con pérdida de estabilidad significativa.

Un análisis de la estructura de D1.3 (Fig. 4) puso de manifiesto que únicamente los restos 99 a 102 (“RDYR”) contactan directamente con la lisozima de la clara de huevo de gallina (HEL) (Fig. 4 B), aunque VH-CDR3 se define con más detalle (Bhat *et al.*, 1994). Debe señalarse que la mitad del terminal C de VH-CDR3 (restos 101 a 104) hacen contacto significativo con el dominio VL (Fig. 4 B). Ha llegado a estar también claro que VH-CDR3 de D1.3 (Fig. 4 C) presenta una espira más corta entre las cadenas F y G que el bucle FG de Fn3 (Fig. 4 D). Por consiguiente, se diseñaron secuencias mutantes utilizando la RDYR (99 a 102) de D1.3 como núcleo y se generaron límites y longitudes de bucle diferentes (Tabla 1). Los bucles más cortos pueden imitar mejor la configuración CDR3 de D1.3, proporcionando de este modo mayor afinidad, pero pueden reducir también de manera significativa la estabilidad eliminando las interacciones naturales de Fn3.

TABLA 1

Secuencias de aminoácidos de los bucles CDR3 con VH de D1.3, CDR3 con VH8 y FG de Fn3 y lista de mutantes planificados

	96	100	105
D1.3	.	.	.
	<u>ARERDYRLDYWGQG</u> (SEC. ID. nº: 1)		
VH8	<u>ARGAVVSYYAMDYWGQG</u> (SEC. ID. nº: 2)		
	75	80	85
Fn3	.	.	.
	<u>YAVTGRGDSPASSKPI</u> (SEC. ID. nº: 3)		
Mutante	Secuencia		
D1.3-1	YAERDYRLDY ---- PI (SEC. ID. nº: 4)		
D1.3-2	YAVRDYRLDY ---- PI (SEC. ID. nº: 5)		
D1.3-3	YAVRDYRLDYASSKPI (SEC. ID. nº: 6)		
D1.3-4	YAVRDYRLDY --- KPI (SEC. ID. nº: 7)		
D1.3-5	YAVRDYR ---- SKPI (SEC. ID. nº: 8)		
D1.3-6	YAVTRDYRL – SSKPI (SEC. ID. nº: 9)		
D1.3-7	YAVTERDYRL – SSKPI (SEC. ID. nº: 10)		
VH8-1	YAVAVVSYYAMDY – PI (SEC. ID. nº: 11)		
VH8-2	YAVTAVVSYYASSKPI (SEC. ID. nº: 12)		

Los subrayados indican restos en las cadenas β . Los caracteres en negrita indican los restos sustituidos.

Además, se seleccionó como plantilla un dominio VH individual anti-HEL denominado VH8 (Ward *et al.*, 1989). El VH8 fue seleccionado por cribado del banco y, a pesar de la carencia del dominio VL, VH8 tiene una afinidad para HEL de 27 nM, debido probablemente a su VH-CDR3 más largo (Tabla 1). Por consiguiente, su VH-CDR3 se injertó en Fn3. Los bucles más largos pueden presentar ventajas en el armazón de Fn3 porque pueden proporcionar mayor afinidad y también son próximos a la longitud del bucle de Fn3 natural. La estructura 3D de VH8 no se conocía y por lo tanto la secuencia CDR3 de VH8 se alineó con la de D1.3 VH-CDR3; se diseñaron dos bucles (Tabla 1).

ES 2 301 198 T3

Construcción y producción de mutantes

Se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida al sitio para obtener secuencias diseñadas. Se obtuvieron dos Fn3 mutantes, D1.3-1 y D1.3-4 (Tabla 1) y ambos se expresaron como proteínas de fusión His-tag. Se purificó D1.3-4 y la fracción His-tag se separó por escisión con trombina. D1.3-4 es soluble hasta por lo menos 1 mM a pH 7,2. No se ha observado ningún agregado de la proteína durante la preparación de la muestra y la adquisición de datos por RMN.

Expresión y purificación de proteínas

BL21 de *E. coli* (DE3) (Novagen) se transformó con un vector de expresión (pAS25, pWE1 y sus derivados) que contiene un gen para el natural o un mutante. Se cultivaron las células en medio M9 mínimo y medio M9 enriquecido con Bactotrypton (Difco) que contenía ampicilina (200 µg/ml). Para el marcado isotópico, ¹⁵N de NH₄Cl y/o ¹³C de glucosa sustituyeron a los componentes no marcados. Se inocularon 500 ml de medio en un matraz con tabique de 2 litros con 10 ml de cultivo toda la noche y se agitó a 37°C. Se añadió isopropilto-β-galactosidasa (IPTG) a una concentración final de 1 mM para iniciar la expresión proteica cuando se alcanza la D.O. (600 nm). Se recogieron las células por centrifugación 3 horas después de la adición de IPTG y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta que su utilización.

Se purificó Fn3 sin His-tag de la manera siguiente. Se pusieron en suspensión las células en 5 ml/(g de célula) de Tris (50 mM, pH 7,6) que contenía ácido etilendiamintetra-acético (EDTA; 1 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mM). Se añadió HEL hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Después de incubar la solución durante 30 minutos a 37°C, se trató por ultrasonidos tres veces durante 30 segundos en hielo. Los desechos celulares se eliminaron por centrifugación. Se añadió sulfato amónico a la solución y se recuperó el precipitado por centrifugación. El sedimento se disolvió en 5 a 10 ml de acetato sódico (50 mM, pH 4,6) y se eliminó el material insoluble por centrifugación. La solución se aplicó a una columna Sephacryl S100HR equilibrada con un tampón de acetato sódico. Las fracciones que contenían Fn3 se aplicaron a continuación a una columna ResourceS (Pharmacia) equilibrada en acetato sódico (50 mM, pH 4,6) y se eluyó con un gradiente lineal de cloruro sódico (0-0,5 M). Se ajustó el protocolo para purificar las proteínas mutantes con diferentes propiedades de carga superficial.

Se purificó Fn3 con His-tag de la forma siguiente. Se preparó la fracción soluble como se describió anteriormente, excepto que el tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7,6) que contiene cloruro sódico (100 mM) sustituyó al tampón Tris. Se aplicó la solución a una columna quelante Hi-Trap (Pharmacia) precargada con níquel y se equilibró en el tampón fosfato. Después de lavar la columna con el tampón, se eluyó His-tag Fn3 en el tampón fosfato que contenía EDTA 50 mM. Se agruparon las fracciones que contenían His-tag-Fn3 y se aplicaron a una columna Sephacryl S100-HR, proporcionando una proteína muy pura. Se escindió la parte His-tag por tratamiento de la proteína de fusión con trombina utilizando el protocolo suministrado por Novagen. Se separó Fn3 del péptido His-tag y trombina mediante una columna ResourceS utilizando el protocolo anterior.

Las proteínas naturales y las dos mutantes hasta ahora examinadas se expresan como proteínas solubles. En el caso en que un mutante se exprese como cuerpos de inclusión (agregado insoluble), se examina en primer lugar si puede expresarse como proteína soluble a baja temperatura (p. ej., 25 a 30°C). Si esto no es posible, se recogen los cuerpos de inclusión por centrifugación a baja velocidad después de la lisis celular como se describió anteriormente. El sedimento se lava con tampón, se trata con ultrasonidos y se centrifuga. Los cuerpos de inclusión se disuelven en tampón fosfato (50 mM, pH 7,6) que contiene cloruro de guanidinio (GdnCl, 6 M) y se cargarán en una columna de quelación Hi-Trap. Se eluye la proteína con el tampón que contiene GdnCl y EDTA 50 mM.

Configuración del mutante D1.3-4 de Fn3

Los espectros RMN de ¹H de la proteína de fusión His-tag D1.3-4 se parecían mucho a los de la natural, lo que sugiere que el mutante está plegado en una configuración similar a la de tipo natural. El espectro de D1.3-4 tras la eliminación del péptido His-tag presentó una gran dispersión espectral. Una gran dispersión de protones de amida (7 a 9,5 ppm) y un gran número protones C^α (5,0 a 6,5 ppm) campo abajo son característicos de la proteína de la lámina β (Wüthrich, 1986).

El espectro 2D NOESY de D1.3-4 proporcionó más pruebas para una configuración conservada. La zona en el espectro mostró interacciones entre los protones de metilo campo arriba (<0,5 ppm) y los protones de metil-metileno. Las resonancias de Val72 y metil estaban muy separadas en el espectro del tipo natural (-0,07 y 0,37 ppm; (Baron *et al.*, 1992)). Las resonancias correspondientes a los dos protones del metilo están presentes en el espectro de D1.3-4 (-0,07 y 0,44 ppm). El pico en cruz entre estas dos resonancias y otros picos en cruz conservados indican que las dos resonancias en el espectro de D1.3-4 son muy probablemente las de Val72 y que otros protones de metilo están en un medio casi idéntico al de la Fn3 natural. Las diferencias menores entre los dos espectros son presumiblemente debidas a una perturbación de la pequeña estructura debida a las mutaciones. Val72 está en la cadena F, donde forma parte del núcleo hidrófobo central de Fn3 (Main *et al.*, 1992). Existen solamente cuatro restos lejos de los restos mutados del bucle FG (Tabla I). Los resultados son notables porque, a pesar de que existen 7 mutaciones y 3 deleciones en el bucle (más del 10% de los restos totales; Fig. 12, Tabla 2), D1.3-4 conserva una estructura 3D prácticamente idéntica a la natural (excepto para el bucle mutado). Por consiguiente los resultados proporcionan un fuerte apoyo de que el bucle FG no contribuye de manera significativa al plegamiento y estabilidad de la molécula Fn3 y por lo tanto que el bucle FG puede mutarse extensamente.

ES 2 301 198 T3

Se determinó también la estabilidad mediante las reacciones de desplegamiento producidas por el cloruro de guanidinio (GdnCl) y la urea. Se registraron las curvas preliminares de desplegamiento utilizando un fluorómetro equipado con una jeringuilla accionada a motor; se añadieron GdnCl o urea continuamente a la solución de proteína en la cubeta. Basándose en las curvas preliminares de desplegamiento, se prepararon las muestras independientes que contienen concentraciones variables de un desnaturalizante y se midió la fluorescencia (excitación) a 290 nm, emisión a 300-400 nm) o CD (elipsicidad a 222 y 215 nm) una vez que las muestras estaban equilibradas a la temperatura de medición durante por lo menos una hora. La curva se ajustó por el método de los mínimos cuadrados a la ecuación para el modelo de dos estados (Santorio y Bolen, 1988; Koide *et al.*, 1993). El cambio en la concentración de proteínas se compensaba si era necesario.

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

Desplegamiento térmico

Se llevó a cabo un experimento de desplegamiento inducido por temperatura en Fn3 utilizando espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para controlar los cambios en la estructura secundaria. El espectro CD de la Fn3 natural presenta una señal débil cerca de 222 nm (Fig. 3A), coherente con la estructura β principalmente de Fn3 (Perczel *et al.*, 1992). Se observa una transición cooperativa de desplegamiento entre 80 y 90°C, que indica claramente gran estabilidad de Fn3 (Fig. 3B). La energía libre de desplegamiento podría no determinarse debido a la falta de referencia después de la transición. El resultado es coherente con la gran estabilidad del primer dominio de Fn3 de la fibronectina humana (Litvinovich *et al.*, 1992), indicando de este modo que los dominios Fn3 son en general muy estables.

Ensayos de fijación

Se caracterizó cuantitativamente la reacción de fijación de los FnAb utilizando un calorímetro de valoración isotérmica (ITC) y espectroscopia de fluorescencia.

Se midieron los cambios de entalpía (ΔH) de fijación utilizando un Omega ITC de Microcal (Wiseman *et al.*, 1989). La celda de la muestra (~1,3 ml) se llenó con solución de los FnAb ($\leq 100 \mu M$, cambiado de acuerdo con K_d) y la celda de referencia se llenó con agua destilada; se equilibró el sistema a una temperatura dada hasta que se obtuvo una referencia estable; se inyectaron 5 a 20 μl de solución de ligando (≤ 2 mM) mediante una jeringuilla accionada a motor en un periodo corto (20 s) seguido de un retraso para equilibrado (4 minutos); se repitió la inyección y se midió la generación/absorción de calor para cada inyección. A partir del cambio en el cambio de calor observado en función de la concentración de ligando, se determinaron ΔH y K_d (Wiseman *et al.*, 1989). ΔG y ΔS se dedujeron de la reacción de fijación a partir de los dos parámetros medidos directamente. Se examinó la desviación de la curva teórica para evaluar la fijación no específica (secuencia múltiple). Se llevaron a cabo también experimentos para colocar un ligando en la celda y valorar con un FnAb. Debe hacerse hincapié en que solamente ITC proporciona la medición directa de ΔH , haciendo posible de este modo evaluar las contribuciones entálpica y entrópica a la energía de fijación. Se utilizó ITC con éxito para controlar la reacción de fijación del D1.3 Ab (Tello *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1994).

Se controla la fluorescencia al medir las reacciones de fijación con K_d en el intervalo sub- μM en el que es difícil la determinación de K_d por ITC. Se controla la fluorescencia de Trp (excitación a ~290 nm, emisión entre 300 y 350 nm) y fluorescencia de Tyr (excitación a ~260 nm, emisión a ~303 nm) a medida que se valora la solución mutante de Fn3 ($\leq 10 \mu M$) con solución de ligando ($\leq 100 \mu M$). Se determina la K_d de la reacción mediante el ajuste no lineal de los mínimos cuadrados de la ecuación de fijación bimolecular. La presencia de las secuencias de fijación secundarias se examina utilizando el análisis de Scatchard. En todos los ensayos de fijación, se llevan a cabo experimentos de control utilizando Fn3 natural (o los FnAb no relacionados) en lugar de los FnAb de interés.

II. *Producción de los mutantes de Fn3 con los FnAb de gran afinidad y especificidad*

Se llevó a cabo el cribado del banco con objeto de seleccionar los FnAb que se unen a ligandos específicos. Esto es complementario con la estrategia de modelado descrita anteriormente. La ventaja del cribado combinatorio es que se puede producir y cribar fácilmente un gran número de variantes ($\geq 10^8$), lo cual no es viable con estrategias de mutagénesis específicas ("diseño racional"). Se utilizó la técnica de expresión en el fago (Smith, 1985; O'Neil y Hoess, 1995) para efectuar procesos de cribado. Se fusionó Fn3 a una proteína de recubrimiento del fago (pIII) y se expresó en la superficie de fagos filamentosos. Estos fagos albergan un genoma de ADN monocatenario que contiene el gen que codifica la proteína de fusión Fn3. La secuencia de aminoácidos de zonas definidas de Fn3 se distribuyó al azar utilizando una secuencia nucleotídica degenerada, construyendo de este modo un banco. Los mutantes de Fn3 que expresan los fagos con capacidades de fijación deseadas se seleccionaron *in vitro*, se recuperaron y se ampliaron. La secuencia de aminoácidos de un clon seleccionado puede identificarse fácilmente secuenciando el gen para Fn3 del fago seleccionado. Se siguieron los protocolos de Smith (Smith y Scout, 1993) con modificaciones menores.

ES 2 301 198 T3

El objetivo era producir los FnAb que tienen gran afinidad para los ligandos de pequeñas proteínas. Se utilizaron como ligandos los dominios HEL y B1 de la proteína G estafilocócica (denominada en lo sucesivo proteína G). La proteína G es pequeña (56 aminoácidos) y muy estable (Minor y Kim, 1994; Smith *et al.*, 1994). Se determinó por espectroscopia de RMN que su estructura (Gronenborn *et al.*, 1991) consistía en una hélice empaquetada contra una lámina β de cuatro cadenas. Los complejos FnAb-proteína G resultantes (~150 restos) son uno de los complejos proteína-proteína más pequeños producidos hasta la fecha, completamente dentro del intervalo de los métodos de RMN directos. El pequeño tamaño, la gran estabilidad y solubilidad de ambos componentes y la capacidad para marcar cada uno con isótopos estables (^{13}C y ^{15}N ; véase a continuación para la proteína G) hacen a los complejos un sistema de modelo ideal para los estudios por RMN en las interacciones proteína-proteína.

La sustitución con éxito del bucle de Fn3 (mutante D1.3-4) demuestra que por lo menos diez restos pueden mutarse sin pérdida de todo el pliegue. Basándose en esto, se construyó en primer lugar un banco en el que solo los restos en el bucle FG están colocados al azar. Una vez se obtuvieron los resultados de los experimentos de sustitución del bucle en el bucle BC, se prolongaron las secuencias de mutación que incluyen el bucle BC y otras secuencias.

Construcción del sistema de expresión en el fago Fn3

Un vector pASM1 de expresión basado en el fago M13 se ha construido de la manera siguiente: un oligonucleótido que codifica el péptido señal de OmpT se clonó en el extremo 5' del gen para Fn3; un fragmento del gen que codifica el dominio C-terminal de M13 pIII se preparó a partir del gen III natural de M13 mp18 utilizando PCR (Corey *et al.*, 1993) y el fragmento se insertó en el extremo 3' del gen OmpT-Fn3; se ha insertado una secuencia espaciadora entre Fn3 y pIII. El fragmento resultante (OmpT-Fn3-pIII) se clonó en la secuencia de clonación múltiple de M13 mp18, donde el gen de fusión está bajo el control del activador lac. Este sistema producirá la proteína de fusión Fn3-pIII así como la proteína pIII natural. Es de esperar que la coexpresión de pIII natural reduzca el número de proteínas de fusión pIII, aumentando de este modo la infectividad del fago (Corey *et al.*, 1993) (cinco copias de pIII están presentes en una partícula de fago). Además, un número más pequeño de proteínas de fusión pIII puede presentar ventajas al seleccionar proteínas de fijación fuerte, porque el efecto quelante debido a las múltiples secuencias de fijación sería más pequeño que con las cinco copias de pIII de fusión (Bass *et al.*, 1990). Este sistema ha expresado con éxito la serina proteasa tripsina (Corey *et al.*, 1993). Se produjeron fagos y se purificaron utilizando K91kan de *E. coli* (Smith y Scout, 1993) según un método normalizado (Sambrook *et al.*, 1989) excepto cuando las partículas de fago estaban purificadas por una segunda precipitación con polietilenglicol y precipitación con ácido.

La expresión exitosa de Fn3 en los fagos de fusión se ha confirmado por ELISA utilizando un Ab contra la fibronectina (Sigma), lo que indica claramente que construir bancos utilizando este sistema es viable.

Puede utilizarse también un sistema alternativo que emplea la fUSE5 (Parmley y Smith, 1988). El gen para Fn3 se inserta en fUSE5 utilizando las secuencias de restricción SfiI introducidas en los extremos 5' y 3' de la PCR del gen para Fn3. Este sistema expresa solamente la proteína de fusión pIII (hasta cinco copias) en la superficie de un fago. Los fagos se producen y purifican como se describe (Smith y Scout, 1993). Este sistema se ha utilizado para expresar muchas proteínas y es robusto. La ventaja de fUSE5 es su baja toxicidad. Esto es debido al bajo número de copias de la forma de replicación (RF) en el hospedador, que a su vez hace difícil preparar una cantidad suficiente de RF para la construcción del banco (Smith y Scout, 1993).

Construcción de bancos

El primer banco se construyó en el dominio de Fn3 expresado en la superficie del fago MB en el que se colocaron al azar siete restos (77 a 83) en el bucle FG (Fig. 4D). La colocación al azar puede conseguirse mediante la utilización de una secuencia nucleotídica degenerada que contiene oligonucleótidos. Se preparó un nucleótido bicatenario mediante el mismo protocolo que para la síntesis génica (véase anteriormente) excepto que una cadena tenía una secuencia (NNK)₆(NNG) en las secuencias de mutación, en las que N corresponde a una mezcla equimolar de A, T, G y C, y K corresponde a una mezcla equimolar de G y T. El codón (NNG) en el resto 83 fue necesario para conservar la secuencia de restricción SacI (Fig. 2). El codón (NNK) codifica los 20 aminoácidos, mientras que el codón NNG codifica 14. Por consiguiente, este banco contenía ~10⁹ secuencias independientes. El banco se construyó ligando el nucleótido bicatenario en un vector de fago natural, pASM1, y el XL1 azul (Stratagene) de *E. coli* transfectante utilizando electroporación. XL1 azul tiene el fenotipo lacI^q y de este modo suprime la expresión de la proteína de fusión Fn3-pIII en ausencia de inductores de lac. El banco inicial se propagó de esta manera, para evitar la selección contra los clones Fn3-pIII tóxicos. Los fagos que expresan la proteína de fusión Fn3-pIII colocada al azar se prepararon propagando fagos con K91kan como hospedador. K91kan no suprime la producción de la proteína de fusión, porque no tiene lacI^q. Se generó también otro banco en el que el bucle BC (restos 26 a 20) estaba colocado al azar.

Selección de los FnAb expresados

Se realizó el cribado de los bancos del fago Fn3 utilizando el protocolo de selección natural (Smith y Scott, 1993); se biotiniló un ligando y se utilizó la interacción fuerte biotina-estreptavidina para inmovilizar el ligando en una placa recubierta con estreptavidina. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (~22°C). Para la recuperación inicial de los fagos de un banco, se inmovilizaron 10 μg de un ligando biotinilado en una placa de poliestireno recubierta con estreptavidina (35 mm, Falcon 1008) y a continuación se añadió una solución del fago (que contenía ~10¹¹ pfu (unidades formadoras de placa)). Después de lavar la placa con un tampón apropiado (por lo

ES 2 301 198 T3

general TBST, Tri-HCl (50 mM, pH 7,5), NaCl (150 mM) y Tween 20 (0,5%), se eluyeron los fagos ligados mediante una de las combinaciones de las condiciones siguientes: pH bajo, adición de un ligando libre, urea (hasta 6 M) y, en el caso de los FnAb anti-proteína G, escindiendo el enlazador proteína G-biotina mediante trombina. Se ampliaron los fagos recuperados utilizando el protocolo habitual que utiliza K91kan como hospedador (Sambrook *et al.*, 1989).
5 Se repitió el proceso de selección 3 a 5 veces para concentrar los clones positivos. A partir de la segunda ronda, la cantidad de ligando disminuyó gradualmente (hasta $\sim 1 \mu\text{g}$) y el ligando biotinilado se mezcló con una solución de fago antes de transferirse a una placa (G. P. Smith, comunicación personal). Después de la ronda final, se seleccionaron 10 a 20 clones, y su secuencia de ADN se determinará. Se midió la afinidad para el ligando de los clones en primer lugar mediante el procedimiento ELISA en el fago (véase a continuación).

10 Para suprimir la fijación potencial del armazón de Fn3 (fijación de fondo) a un ligando, puede añadirse Fn3 natural como competidor en los tampones. Además, pueden utilizarse proteínas no relacionadas (p. ej., albúmina de suero bovino, citocromo c y RNasa A) como competidores para seleccionar los FnAb muy específicos.

15 *Ensayo de fijación*

La afinidad para la fijación de los FnAb sobre la superficie del fago se caracteriza semicuantitativamente utilizando la técnica ELISA en el fago (Li *et al.*, 1995). Se recubrieron pocillos de placas de microvaloración (Nunc) con una proteína del ligando (o con estreptavidina seguida de la fijación de un ligando biotinilado) y se bloqueó con la solución de Blotto (Pierce). Se añaden a cada pocillo fagos purificados ($\sim 10^{10}$ pfu) que se originan en placas individuales (M13)/colonias (fUSE5) y se incuban durante la noche a 4°C. Después de lavar los pocillos con un tampón apropiado (véase anteriormente), se detectan los fagos ligados por el protocolo ELISA habitual utilizando anti-M13 Ab (conejo, Sigma) y conjugado Ig-peroxidasa anti-conejo (Pierce) o utilizando el conjugado anti-M13 Ab-peroxidasa (Pharmacia). Se realizaron análisis colorimétricos utilizando TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Pierce). La gran afinidad de la proteína G para las inmunoglobulinas presenta un problema especial; no pueden utilizarse los Ab en la detección. Por consiguiente, para detectar los FnAb de la anti-proteína G, se inmovilizan los fagos de fusión en los pocillos y se mide a continuación la fijación utilizando proteína G biotinilada seguida de la detección que utiliza el conjugado estreptavidina-peroxidasa.

30 *Producción de los FnAb solubles*

Tras la caracterización preliminar de los Fn3 mutantes que utilizan ELISA en el fago, los genes mutantes se subclonan en el vector de expresión pEW1. Se producen proteínas mutantes tales como las proteínas de fusión His-tag y se purifican, y se caracterizan su conformación, estabilidad y afinidad del ligando.

35 De este modo, Fn3 es el cuarto ejemplo de un andamio inmunoglobulinoide monomérico que puede utilizarse para modificar biológicamente las proteínas de fijación. La selección con éxito de nuevas proteínas de fijación se ha basado también en el minicuerpo, tendamistat y en los andamios del dominio VH de la inmunoglobulina "camellizada" (Martin *et al.*, 1994; Davies y Riechmann, 1995; McConnell y Hoess, 1995). El andamio de Fn3 presenta ventajas sobre estos sistemas. Bianchi *et al.* publicaron que la estabilidad de un minicuerpo era de 2,5 kcal/mol, significativamente inferior a la de Ubi4-K. Hasta la fecha no se ha publicado ninguna caracterización estructural detallada de los minicuerpos. Tendamistat y el dominio VH contienen enlaces disulfuros, y por lo tanto la preparación de las proteínas correctamente plegadas puede ser difícil. Davies y Riechmann publicaron que los rendimientos de sus dominios VH camellizados eran inferiores a 1 mg por litro de cultivo (Davies y Riechmann, 1996).

45 Por lo tanto, puede utilizarse el armazón de Fn3 como andamio para reconocimiento molecular. Su pequeño tamaño, estabilidad y estructura bien caracterizada hacen de Fn3 un sistema atractivo. A la luz de la omnipresencia de Fn3, en una amplia mayoría de proteínas naturales implicadas en la fijación del ligando, se puede modificar genéticamente las proteínas de fijación a base de Fn3 para diferentes clases de dianas.

50 Los ejemplos siguientes se pretende que ilustren pero no limiten la invención.

Ejemplo I

55 *Construcción del gen para Fn3*

Se diseñó un gen sintético para el décimo Fn3 de fibronectina (Fig. 1) basándose en los restos 1416-1509 de aminoácidos de la fibronectina humana (Kornbliht, *et al.*, 1985) y en su estructura tridimensional (Main, *et al.*, 1992). Se modificó genéticamente el gen para incluir las secuencias de restricción convenientes para la mutagénesis y se utilizaron los denominados "codones preferidos" para la expresión proteica de alto nivel (Gribskov *et al.*, 1984). Además, se insertó un resto de glutamina después del terminal N de la metionina con objeto de impedir el tratamiento parcial del terminal N de la metionina que con frecuencia degrada el espectro RMN (Smith, *et al.*, 1994). Los reactivos químicos eran de calidad analítica o mejor y se adquirieron en Sigma Chemical Company y J.T. Baker, a menos que se indique de otro modo. Se llevaron a cabo procedimientos de ADN recombinante tal como se describe en "Molecular Cloning" (Sambrook, *et al.*, 1989), a menos que se indique de otro modo. Los oligonucleótidos habituales se adquirieron en Operon Technologies. Las enzimas de restricción y modificación fueron de New England Biolabs.

ES 2 301 198 T3

Se montó el gen de la manera siguiente. En primer lugar, la secuencia génica (Fig. 5) se dividió en cinco partes con los límites en las secuencias de restricción diseñadas: fragmento 1, NdeI-PstI (oligonucleótidos FN1F y FN1R (Tabla 2); fragmento 2, PstI-EcoRI (FN2F y FN2R); fragmento 3, EcoRI-SalI (FN3F y FN3R); fragmento 4, SalI-SacI (FN4F y FN4R); fragmento 5, SacI-BamHI (FN5F y FN5R). En segundo lugar, para cada parte, se sintetizó un par de oligonucleótidos que codifican cadenas opuestas y tienen solapamientos complementarios de aproximadamente 15 bases. Estos oligonucleótidos se denominaron FN1F-FN5R y se presentan en la Tabla 2. En tercer lugar, se hibridó cada par (p. ej., FN1F y FN1R) y se completaron las zonas monocatenarias utilizando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa. En cuarto lugar, se digirió el oligonucleótido bicatenario con las enzimas de restricción relevantes en los terminales del fragmento y se clonaron en el plásmido pBlueScript (Stratagene) que se había digerido con las mismas enzimas que las utilizadas para los fragmentos. La secuencia de ADN del fragmento insertado se confirmó mediante secuenciado del ADN utilizando un secuenciador de ADN de Applied Biosystems y el protocolo de terminación dideoxi proporcionado por el fabricante. Por último, se repitieron las etapas 2 a 4 para obtener el gen completo.

Se clonó también el gen en los vectores pET3a y pET15b (Novagen) (pAS45 y pAS25, respectivamente). En las Figs. 6 y 7 se presentan las cartografías de los plásmidos. BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen) que contiene estos vectores expresó el gen para Fn3 bajo el control del activador T7 del bacteriófago (Studier, *et al.*, 1990); pAS24 expresa la proteína Fn3 de 96 restos solamente, mientras que pAS45 expresa a Fn3 como proteína de fusión con el péptido poli-histidina (His-tag). La expresión de alto nivel de la proteína Fn3 y sus derivados en *E. coli* fue detectada como una banda intensa en SDS-PAGE teñido con CBB.

La reacción de fijación de los monocuerpos se caracteriza cuantitativamente mediante espectroscopia de fluorescencia utilizando monocuerpos solubles purificados.

La fluorescencia intrínseca se controla para medir las reacciones de fijación. Se controla la fluorescencia de Trp (excitación a ~290 nm, emisión entre 300 y 350 nm) y la fluorescencia de Tyr (excitación a ~260 nm, emisión a ~303 nm) como la solución de Fn3 mutante ($\leq 100 \mu\text{M}$) se valora con una solución de ligando. Cuando un ligando es fluorescente (p. ej. fluoresceína), la fluorescencia del ligando puede utilizarse. K_d de la reacción se determinará por ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la ecuación de la fijación bimolecular.

Si no puede utilizarse la fluorescencia intrínseca para controlar la reacción de fijación, los monocuerpos se marcan con fluoresceína-NHS (Pierce) y se utiliza polarización con fluorescencia para controlar la reacción de fijación (Burke *et al.*, 1996).

Ejemplo II

Modificaciones para incluir secuencias de restricción en el gen para Fn3

Se incorporaron secuencias de restricción en el gen para Fn3 sintético sin cambiar el Fn3 con la secuencia de aminoácidos. Se seleccionaron las posiciones de las secuencias de restricción de modo que la construcción del gen pudiera completarse sin sintetizar oligonucleótidos largos (>60 bases) y de modo que dos zonas con bucle pudieran mutarse (incluyendo por aleatorización) por el procedimiento de mutagénesis por inserción de un casete (es decir, intercambiando un fragmento por otro fragmento sintético que contiene las mutaciones). Además, se seleccionaron secuencias de restricción de modo que la mayoría de las secuencias fueran únicas en el vector para la expresión en el fago. Las secuencias de restricción exclusivas permiten recombinar los clones del monocuerpo que se han seleccionado ya con objeto de suministrar un espacio mayor de la secuencia.

Ejemplo III

Construcción de los bancos de expresión en el fago M13

Se construyó un vector para expresión en el fago, pAS38 (para su cartografía, véase Fig. 8) de la manera siguiente. El fragmento XbaI-BamHI del pET12a que codifica el péptido señal de OmpT se clonó en el extremo 5' del gen para Fn3. La zona C-terminal (desde los oligonucleótidos FN5F y FN5R, véase Tabla 2) del gen para Fn3 se sustituyó por un nuevo fragmento constituido por los oligonucleótidos FN5F y FN5R' (Tabla 2) que introdujo una secuencia MluI y la secuencia enlazadora para construir una proteína de fusión con la proteína pIII del bacteriófago M13. Se preparó un fragmento del gen que codifica el dominio C-terminal de M13 pIII a partir del gen III natural de M13mp18 utilizando PCR (Corey, *et al.*, 1993) y el fragmento se insertó en el extremo 3' del gen de fusión OmpT-Fn3 utilizando las secuencias MluI y HindIII.

Se produjeron fagos y se purificaron utilizando un fago cooperador M13K07 según un procedimiento normalizado (Sambrook, *et al.*, 1989) excepto que las partículas de fago se purificaron mediante una segunda precipitación con polietilenglicol. La expresión con éxito de Fn3 sobre los fagos de fusión fue confirmada por ELISA (Harlow y Lane, 1988) utilizando un anticuerpo contra la fibronectina (Sigma) y un anticuerpo anti-FN3 habitual (Cocalico Biologicals, PA, EUA).

ES 2 301 198 T3

Ejemplo IV

Bancos que contienen variegaciones del bucle en el bucle AB

5 Se prepara un banco de expresión en el fago del ácido nucleico que tiene variegación en el bucle AB por los procedimientos siguientes. La colocación al azar se consigue mediante la utilización de oligonucleótidos que contienen la secuencia nucleotídica degenerada. Los restos que van a ser variegados se identifican mediante el examen por rayos X y las estructuras RMN de Fn3 (números de registro en el Protein Data Bank, 1FNA y 1TTF, respectivamente). Se sintetizan los oligonucleótidos que contienen NNK (N y K indican aquí una mezcla equimolar de A, T, G y C y una
10 mezcla equimolar de G y T, respectivamente) para los restos variegados (véase, por ejemplo, los oligonucleótidos BC3, FG2, FG3 y FG4 en la Tabla 2). Los códigos de la mezcla NNK para los veinte aminoácidos y un codón de terminación (TAG). TAG, sin embargo, se suprime en XL-1 azul de *E. coli*. Los ADN monocatenarios de pAS38 (y sus derivados) se preparan utilizando un protocolo habitual (Sambrook, *et al.*, 1989).

15 La mutagénesis dirigida al sitio se lleva a cabo siguiendo los procedimientos publicados (véase por ejemplo, Kunkel, 1985) utilizando un kit Muta-Gene (BioRad). Los bancos se construyen por electroporación de células competentes por electroporación de XL-1 azul de *E. coli* (200 μ l; Stratagene) con 1 μ g del ADN del plásmido utilizando una cubeta con abertura de 1 mm con manipulador ECM 395 de electrocelda BTX. Una parte de las células transformadas se coloca en una placa con LB-agar-agar que contiene ampicilina (100 μ g/ml) para determinar la eficacia
20 de transformación. Por lo general, se obtienen 3×10^8 transformantes con 1 μ g de ADN, y de este modo un banco contiene 10^8 a 10^9 clones independientes. Las partículas de fagómito se prepararon tal como se describió anteriormente.

25 Ejemplo V

Variegaciones de bucle en el bucle BC, CD, DE, EF o FG

Se preparó un banco de expresión en el fago de ácido nucleico que tiene cinco restos variegados (restos números
30 26 al 30) en el bucle BC, y uno que tiene siete restos variegados (restos números 78 al 84) en el bucle FG, utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo IV anterior. Otros bancos de expresión en el fago del ácido nucleico que tienen variegación en el bucle CD, DE o EF pueden prepararse por procedimientos similares.

35 Ejemplo VI

Variegaciones de bucle en los bucles FG y BC

Se preparó un banco de expresión en el fago de ácido nucleico que tiene siete restos variegados (restos números 78
40 al 84) en el bucle FG y cinco restos variegados (restos números 26 al 30) en el bucle BC. Se prepararon variegaciones en el bucle BC por mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel, *et al.*) utilizando el oligonucleótido BC3 descrito en la Tabla 1. Se introdujeron variegaciones en el bucle FG utilizando mutagénesis dirigida al sitio que utiliza el banco del bucle BC como material de partida, resultando de este modo bancos que contienen variegaciones tanto en los bucles BC como en los FG. El oligonucleótido FG2 tiene los restos 78 al 84 de variegación y el oligonucleótido FG4 tiene los
45 restos de variegación 77 al 81 y una eliminación de los restos 82 al 84.

Se preparó un banco de expresión en el fago de ácido nucleico que tiene cinco restos variegados (restos números
50 78 al 84) en el bucle FG y una eliminación de tres restos (restos 82 al 84) en el bucle FG y cinco restos variegados (restos números 26 al 30) en el bucle BC. Se construyó el bucle FG más corto en un intento de reducir la flexibilidad del bucle FG; se demostró que el bucle era muy flexible en Fn3 por los estudios de RMN de Main, *et al.* (1992). Un bucle muy flexible puede presentar ventajas para formar una secuencia de fijación con gran afinidad (es de esperar una gran pérdida de entropía en la fijación del ligando, porque el bucle flexible se volvería más rígido). Además, otros dominios de Fn3 (además del humano) tienen bucles FG más cortos (para la alineación de la secuencia, véase la Figura 12 en Dickinson, *et al.* (1994)).

55 La colocación al azar se consiguió mediante la utilización de oligonucleótidos que contienen la secuencia nucleotídica degenerada (oligonucleótido BC3 para la variegación del bucle BC y oligonucleótidos FG2 y FG4 para la variegación de los bucles de FG).

60 Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio siguiendo los procedimientos publicados (véase, por ejemplo, Kunkel, 1985). Se construyeron los bancos por electrotransformación de XL-1 azul de *E. coli* (Stratagene). Por lo general un banco contiene de 10^8 a 10^9 clones independientes. El banco 2 contiene cinco restos variegados en el bucle BC y siete restos variegados en el bucle FG. El banco 4 contiene cinco restos variegados en cada uno de los bucles BC y FG y la longitud del bucle FG fue acertada en tres restos.

65

Ejemplo VII

Bancos de expresión en el fago fd contruidos con variegaciones del bucle

5 Se construyen bancos de expresión en el fago utilizando el fago fd como vector genético. Se inserta en gen para Fn3 en fUSE5 (Parmley y Smith, 1988) utilizando las secuencias de restricción SfiI que se introducen en los extremos 5' y 3' del gen para Fn3 utilizando PCR. La expresión de este fago produce la expresión en la proteína pIII de fusión en la superficie del fago fd. Las variegaciones en los bucles de Fn3 se introducen utilizando mutagénesis dirigida al sitio tal como se describe anteriormente en la presente memoria, o subclonando los bancos de Fn3 contruidos en el fago M13 en el vector fUSE5.

Ejemplo VIII

15 *Otros bancos de expresión en el fago*

Los bancos del fago T7 (Novagen, Madison, WI) y los sistemas de expresión bacteriana pili (Invitrogen) son también útiles para expresar el gen para Fn3.

Ejemplo IX

Aislamiento de polipéptidos que se fijan a estructuras macromoleculares

25 Se llevó a cabo la selección de los monocuerpos expresados en el fago siguiendo los protocolos de Barbas y colaboradores (Rosenblum y Barbas, 1995). En resumen, se inmovilizó en los pocillos de una placa de microvaloración (Maxisorp, Nunc) aproximadamente 1 μ g de molécula diana ("antígeno") en tampón de carbonato sódico (100 mM, pH 8,5) incubando durante la noche a 4°C en un recipiente hermético. Después de la eliminación de esta solución, se bloquearon a continuación los pocillos con una solución al 3% de BSA (Sigma, fracción V) en TBS incubando la placa a 37°C durante 1 hora. Una solución del banco fagómico (50 μ l) que contiene aproximadamente 10¹² unidades formadoras de colonias (cfu) de fagómico se absorbió en cada pocillo a 37°C durante 1 hora. Los pocillos se lavaron a continuación tres veces con un tampón apropiado (por lo general TBST, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,5%) (una vez en la primera ronda). Se eluyeron los fagos ligados mediante una solución ácida (por lo general, glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2; 50 μ l) y los fagos recuperados se neutralizaron inmediatamente con 3 μ l de solución Tris. Alternativamente, se eluyeron los fagos ligados incubando los pocillos con 50 μ l de TBS que contenía el antígeno (1 a 10 μ M). Se ampliaron los fagos recuperados utilizando el protocolo habitual que emplea las células XL1 azules como hospedadores (Sambrook, *et al.*). El proceso de selección se repitió 5 a 6 veces para concentrar los clones positivos. Después de la ronda final se seleccionaron los clones individuales y se determinaron sus afinidades de fijación y las secuencias de ADN.

40 Las afinidades de fijación de los monocuerpos en la superficie del fago se caracterizaron utilizando la técnica ELISA en el fago (Li, *et al.*, 1995). Se recubrieron los pocillos de las placas de microvaloración (Nunc) con un antígeno y se bloquearon con BSA. Se añadieron a cada pocillo fagos purificados (10⁸-10¹¹ cfu) procedentes de una sola colonia y se incubaron 2 horas a 37°C. Después de lavar los pocillos con un tampón apropiado (véase anteriormente), se detectaron los fagos ligados por un protocolo ELISA convencional utilizando anticuerpo anti-M13 (conejo, Sigma) y conjugado Ig-peroxidasa anti-conejo (Pierce). Se llevaron a cabo ensayos colorimétricos utilizando Turbo-TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Pierce) como sustrato.

50 Las afinidades de fijación de los monocuerpos en la superficie del fago se caracterizaron más utilizando el método ELISA de competencia (Djavadi-Ohanian, *et al.*, 1996). En este experimento, se realizó el ELISA en el fago de la misma manera que se ha descrito anteriormente, excepto que la solución de fago contiene un ligando a varias concentraciones. La solución del fago se incubó a 4°C durante una hora antes de la fijación de un ligando inmovilizado en un pocillo de la placa de microvaloración. Las afinidades de los monocuerpos expresados por el fago se estiman mediante la disminución en la señal de ELISA a medida que aumenta la concentración de ligando libre.

55 Después de la caracterización preliminar de los monocuerpos expresados en la superficie del fago que utilizan ELISA en el fago, se subclonaron los genes para los clones positivos en el vector de expresión pAS45. BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen) se transformó con un vector de expresión (pAS45 y sus derivados). Se cultivaron células en un medio M9 mínimo y en un medio M9 enriquecido con Bactotryptona (Difco) que contiene ampicilina (200 μ g/ml). Para el marcado isotópico, NH₄Cl con ¹⁵N y/o glucosa con ¹³C sustituyó a los componentes no marcados. Se adquirieron isótopos estables en Isotec y Cambridge Isotope Labs. Se inocularon 500 ml de medio en un matraz con 21 tabiques con 10 ml de cultivo de toda la noche y se agitó a aproximadamente 140 rpm a 37°C. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para producir la expresión proteica cuando D.O. (600 nm) alcanzó aproximadamente 1,0. Se recogieron las células por centrifugación 3 horas después de la adición de IPTG y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta que se utilicen.

65 Fn3 y anticuerpos con His-tag se purificaron de la forma siguiente. Se pusieron en suspensión células en 5 ml/(celda g) de Tris 50 mM (pH 7,6) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM. Se añadió HEL (Sigma, cristalizado 3

ES 2 301 198 T3

veces) hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Después de incubar la solución durante 30 min. a 37°C, se sometió a ultrasonidos a fin de producir la descomposición celular tres veces durante 30 segundos en hielo. Se eliminó el residuo celular por centrifugación a 15.000 rpm en una centrifugadora RC-2B de Sorval utilizando un rotor SS-34. Se añade cloruro sódico concentrado a la solución hasta una concentración final de 0,5 M. A continuación se aplica la solución a una columna de quelación HisTrap™ de 1 ml (Pharmacia) precargada con cloruro de níquel (0,1 M, 1 ml) y se equilibra en el tampón Tris (50 mM, pH 8,0) que contiene cloruro sódico 0,5 M. Después de lavar la columna con el tampón, se eluyó la proteína ligada con tampón Tris (50 mM, pH 8,0) que contenía imidazol 0,5 M. Este fragmento His-tag se escindió, cuando se requería, tratando la proteína de fusión con trombina utilizando el protocolo suministrado por Novagen (Madison, WI). Se separó Fn3 del péptido His-tag y trombina mediante una columna Resources® (Pharmacia) utilizando un gradiente lineal de cloruro sódico (0-0,5 M) en tampón de acetato sódico (20 mM, pH 5,0).

Se prepararon pequeñas cantidades de monocuerpos solubles de la forma siguiente. Las células XL-1 azules que contenían los derivados de pAS38 (proteínas de fusión Fn3-pIII que codifican los plásmidos) se cultivaron en medio LB a 37°C con agitación intensa hasta que el D.O. (600 nm) alcance aproximadamente 1,0; se añadió IPTG al cultivo hasta una concentración final de 1 mM, y las células se continuaron cultivando durante la noche a 37°C. Se eliminaron las células del medio por centrifugación, y se aplicó el sobrenadante a un pocillo de microvaloración recubierto con un ligando. Aunque las células XL-1 azules que contienen pAS38 y sus derivados expresan las proteínas de fusión Fn3-pIII, las proteínas solubles se producen también debido a la escisión del enlazador entre las zonas de Fn3 y pIII por actividades proteolíticas de *E. coli* (Rosenblum y Barbas, 1995). Se examinó la fijación de un monocuerpo al ligando por el protocolo ELISA habitual utilizando el anticuerpo de costumbre contra Fn3 (adquirido en Cocalico Biologicals, Reamstown, PA). Se utilizaron también monocuerpos solubles obtenidos de la fracción periplásmica de las células *E. coli* utilizando un procedimiento habitual de choque osmótico.

Ejemplo X

Monocuerpo de fijación a la ubiquitina

La ubiquitina es una proteína pequeña (76 restos) implicada en la serie de reacciones de degradación en eucariotas. Es una proteína globular con un solo dominio. Se adquirió ubiquitina de levadura en Sigma Chemical Company y se utilizó sin purificación adicional.

Se utilizaron los bancos 2 y 4, descritos en el Ejemplo VI anterior, para seleccionar monocuerpos de fijación a la ubiquitina. Se inmovilizó la ubiquitina (1 µg en 50 µl de tampón de bicarbonato sódico (100 mM, pH 8,5)) en los pocillos de una placa de microvaloración, seguido de bloqueo con BSA (3% en TBS). Se realizó la selección por afinidad como se ha descrito anteriormente. En las dos primeras rondas, se inmovilizaron 1 µg de ubiquitina por pocillo y los fagos ligados se eluyeron con una solución ácida. A partir de la tercera a la sexta rondas, se inmovilizaron 0,1 µg de ubiquitina por pocillo y los fagos se eluyeron con una solución ácida o con TBS que contenía ubiquitina 10 µM.

La fijación de los clones seleccionados se determinó en primer lugar en modo policlonal, es decir, antes de aislar los clones individuales. Los clones seleccionados de todos los bancos presentaban fijación significativa para la ubiquitina. Estos resultados se presentan en la Figura 9. La fijación a la ubiquitina inmovilizada de los clones fue inhibida casi completamente por menos de ubiquitina soluble 30 µM en los experimentos de ELISA de competencia (véase la Fig. 10). En la Tabla 3 se presentan las secuencias de los bucles BC y FG de los monocuerpos de fijación de la ubiquitina.

TABLA 3

Secuencias de los monocuerpos que se unen a la ubiquitina

	Denominación	Bucle BC	Bucle FG	Casos (si hay más de uno)
50	211	CARRA (SEC. ID. nº: 31)	RWIPLAK (SEC. ID. nº: 32)	2
55	212	CWRRRA (SEC. ID. nº: 33)	RWVGLAW (SEC. ID. nº: 34)	
	213	CKHRR (SEC. ID. nº: 35)	FADLWWR (SEC. ID. nº: 36)	
	214	CRRGR (SEC. ID. nº: 37)	RGFMWLS (SEC. ID. nº: 38)	
	215	CNWRR (SEC. ID. nº: 39)	RAYRYRW (SEC. ID. nº: 40)	
60	411	SRLRR (SEC. ID. nº: 41)	PPWRV (SEC. ID. nº: 42)	9
	422	ARWTL (SEC. ID. nº: 43)	RRWWW (SEC. ID. nº: 44)	
	424	GQRTF (SEC. ID. nº: 45)	RRWWA (SEC. ID. nº: 46)	

El clon 411, que fue el clon más enriquecido, se caracterizó utilizando ELISA en el fago. El clon 411 presentaba fijación selectiva e inhibición de la fijación en presencia de ubiquitina aproximadamente 10 µM en solución (Fig. 11).

Ejemplo XI

Procedimientos para la inmovilización de pequeñas moléculas

5 Se inmovilizaron moléculas diana en los pocillos de una placa de microvaloración (Maxisorp, Nunc) como se describe a continuación, y se bloquearon los pocillos con BSA. Además de la utilización de una proteína portadora como se describe a continuación, puede prepararse un conjugado de una molécula diana en biotina. El ligando biotilado puede inmovilizarse a continuación en un pocillo de la placa de microvaloración que se ha recubierto con estreptavidina.

10 Además la utilización de una proteína portadora como se describe a continuación, pudo construirse un conjugado de una molécula diana y biotina (Pierce) e inmovilizar un ligando biotilado en un pocillo de una placa de microvaloración que ha sido recubierto con estreptavidina (Smith y Scout, 1993).

15 Pueden conjugarse pequeñas moléculas con una proteína portadora tal como albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) y absorberse pasivamente para el pocillo de la placa de microvaloración. Alternativamente, pueden utilizarse también procedimientos de conjugación química. Además, pueden emplearse fácilmente otros soportes sólidos aparte de las placas de microvaloración.

20 Ejemplo XII

Monocuerpo de fijación a fluoresceína

25 Se ha utilizado fluoresceína como diana para la selección de anticuerpos de bancos combinatorios (Barbas, *et al.*, 1992). Se adquirió NHS-fluoresceína en Pierce y se utilizó según las instrucciones del fabricante para preparar conjugados con BSA (Sigma). Se prepararon dos tipos de conjugados fluoresceína-BSA con relaciones molares aproximadas de 17 (fluoresceína) a uno (BSA).

30 Se repitió 5 a 6 veces el procedimiento de selección para concentrar clones positivos. En este experimento, se incubó el banco de fagos con una mezcla de proteínas (BSA, citocromo C (Sigma, caballo) y RNasa (Sigma, bovino), (1 mg/ml de cada uno) a temperatura ambiente durante 30 minutos, antes de la adición a los pocillos recubiertos con ligando. El fago ligado se eluyó con TBS que contiene fluoresceína soluble 10 μ M, en lugar de elución con ácido. Después de la ronda final, se seleccionaron los clones individuales y se determinaron sus afinidades de fijación (véase a continuación) y las secuencias de ADN.

TABLA 4

Clones del banco nº 2

	<u>BC</u>	<u>FG</u>
45	WT	AVTVR (SEC. ID. nº: 47)
		RGDSPAS (SEC. ID. nº: 48)
	PLB24.1	CNWRR (SEC. ID. nº: 49)
50	PLB24.2	CMWRA (SEC. ID. nº: 51)
	PLB24.3	ARMRE (SEC. ID. nº: 53)
	PLB24.4	CARRR (SEC. ID. nº: 55)
	PLB24.5	CNWRR (SEC. ID. nº: 57)
55	PLB24.6	RWRER (SEC. ID. nº: 59)
	PLB24.7	CNWRR (SEC. ID. nº: 61)
	PLB24.8	ERRVP (SEC. ID. nº: 63)
	PLB24.9	GRGAG (SEC. ID. nº: 65)
60	PLB24.11	CRWTR (SEC. ID. nº: 67)
	PLB24.12	CNWRR (SEC. ID. nº: 69)
		RAYRYRW (SEC. ID. nº: 50)
		RWGMLRR (SEC. ID. nº: 52)
		RWLRGRY (SEC. ID. nº: 54)
		RRAGWGW (SEC. ID. nº: 56)
		RAYRYRW (SEC. ID. nº: 58)
		RHPWTER (SEC. ID. nº: 60)
		RAYRYRW (SEC. ID. nº: 62)
		RLLLWQR (SEC. ID. nº: 64)
		FGSFERR (SEC. ID. nº: 66)
		RRWFDGA (SEC. ID. nº: 68)
		RAYRYRW (SEC. ID. nº: 70)

65

ES 2 301 198 T3

TABLA 4 (continuación)

Clones del banco nº 4

WT	AVTVR (SEC. ID. nº: 71)	GRGDS (SEC. ID. nº: 72)
5		
PLB25.1	GQRTF (SEC. ID. nº: 73)	RRWWA (SEC. ID. nº: 74)
10	PLB25.2 GQRTF (SEC. ID. nº: 75)	RRWWA (SEC. ID. nº: 76)
PLB25.3	GQRTF (SEC. ID. nº: 77)	RRWWA (SEC. ID. nº: 78)
PLB25.4	LRYRS (SEC. ID. nº: 79)	GWRWR (SEC. ID. nº: 80)
PLB25.5	GQRTF (SEC. ID. nº: 81)	RRWWA (SEC. ID. nº: 82)
15	PLB25.6 GQRTF (SEC. ID. nº: 83)	RRWWA (SEC. ID. nº: 84)
PLB25.7	LRYRS (SEC. ID. nº: 85)	GWRWR (SEC. ID. nº: 86)
PLB25.9	LRYRS (SEC. ID. nº: 87)	GWRWR (SEC. ID. nº: 88)
PLB25.11	GQRTF (SEC. ID. nº: 89)	RRWWA (SEC. ID. nº: 90)
20	PLB25.12 LRYRS (SEC. ID. nº: 91)	GWRWR (SEC. ID. nº: 92)

La caracterización preliminar de las afinidades de fijación de los clones seleccionados se llevó a cabo utilizando el ELISA en el fago y el ELISA en el fago de competencia (véase la Fig. 12 (fluoresceína-1) y la Fig. 13 (fluoresceína-2)). Los cuatro clones analizados presentaban fijación específica para los pocillos recubiertos con ligando y las reacciones de fijación se inhiben por fluoresceína soluble (véase la Fig. 13).

Ejemplo XIII

30 *Monocuerpo de fijación a la digoxigenina*

El ácido digoxigenina-3-O-metil-carbonil-e-aminocaprónico-NHS (Boehringer Mannheim) se utiliza para preparar el conjugado digoxigenina-BSA. Se lleva a cabo la reacción de acoplamiento siguiendo las instrucciones del fabricante. El conjugado digoxigenina-BSA se inmoviliza en los pocillos de una placa de microvaloración y se utiliza para la selección por afinidad. La selección por afinidad se repite 5 a 6 veces para enriquecer los clones de fijación. Debido a que la digoxigenina es apenas soluble en solución acuosa, los fagos ligados se eluyen del pocillo utilizando solución ácida. Véase el Ejemplo XIV.

40 Ejemplo XIV

Monocuerpos que se fijan a TSAC (compuesto análogo del estado de transición)

Se seleccionan monocuerpos que hidrolizan el carbonato de la forma siguiente. Se sintetiza un análogo en estado de transición para la hidrólisis del carbonato, fosfonato de 4-nitrofenilo mediante una reacción de Arbuzov como se ha descrito anteriormente (Jacobs y Schultz, 1987). El fosfonato se acopla a continuación a la proteína portadora, BSA, utilizando carbodiimida, seguido de diálisis exhaustiva (Jacobs y Schultz, 1987). El conjugado de hapteno-BSA se inmoviliza en los pocillos de una placa de microvaloración y se lleva a cabo la selección del monocuerpo como se describió anteriormente. Se determinan las actividades catalíticas de los monocuerpos seleccionados utilizando carbonato de 4-nitrofenilo como sustrato.

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

55 Ejemplo XV

Caracterización por RMN de Fn3 y comparación del Fn3 segregado por levadura con el segregado por E. coli

60 Se llevaron a cabo experimentos por resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar la superficie de contacto entre FnAb y una molécula diana, p. ej., monocuerpos para fluoresceína, ubiquitina, RNasa A y derivados solubles de digoxigenina. La información se utiliza a continuación para mejorar la afinidad y especificidad del monocuerpo. Se disuelven muestras de monocuerpo purificado en un tampón apropiado para espectroscopia por RMN utilizando la celda de ultrafiltración Amicon con una membrana YM-3. Se preparan tampones con 90% de H₂O/10% de D₂O (calidad destilada, Isotec) o con 100% de D₂O. Se utilizan compuestos deuterados (p. ej. acetato) para eliminar las potentes señales procedentes de ellos.

ES 2 301 198 T3

Se llevan a cabo experimentos por RMN en un espectrómetro Unity INOVA 600 de Varian equipado con cuatro canales RF y una sonda de triple resonancia con capacidad de gradiente de campo pulsado. Se analizan los espectros RMN utilizando programas de tratamiento tal como Felix (Molecular Simulations), nmrPipe, PIPP y CAPP (Garrett, *et al.*, 1991; Delaglio, *et al.*, 1995) en estaciones de trabajo UNIX. Se preparan asignaciones de resonancia específica para la secuencia utilizando una estrategia bien establecida que utiliza una serie de experimentos de triple resonancia (CBCA(CO)NH y HNCACB) (Grzesiek y Bax, 1992; Wittenkind y Mueller, 1993).

Se observa el efecto nuclear de Overhauser (NOE) entre los núcleos de ^1H más próximos de aproximadamente 5 Å, lo que permite obtener información sobre las distancias entre los protones. Se llevan a cabo una serie de experimentos de doble y triple resonancia (Tabla 5; para los estudios recientes en estas técnicas, véase Bax y Grzesiek, 1993 y Kay, 1995) para recoger las limitaciones de distancia (es decir NOE) y del ángulo dihédrico (acoplamiento de J). Se llevan a cabo experimentos con isótopos filtrados para determinar las asignaciones de resonancia del ligando unido y para obtener las limitaciones de distancia en el ligando y aquellas entre FnAb y el ligando. Los detalles de las asignaciones de la resonancia específica para la secuencia y las asignaciones para el pico NOE se han descrito con detalle en otra parte (Clare y Gronenborn, 1991; Pascal, *et al.*, 1994b; Metzler, *et al.*, 1996).

TABLA 5

Experimentos por RMN para caracterización de la estructura

<u>Denominación del experimento</u>	<u>Referencia</u>
1. espectros de referencia	
2D- ^1H , ^{15}N -HSQC	(Bodenhausen y Ruben, 1980; Kay, <i>et al.</i> , 1992)
2D- ^1H , ^{13}C -HSQC	(Bodenhausen y Ruben, 1980; Vuister y Bax, 1992)
2. asignaciones de resonancia en el eje central y cadena lateral de proteína marcada con $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$	
3D-CBCA(CO)NH	(Grzesiek y Bax, 1992)
3D-HNCACB	(Wittenkind y Mueller, 1993)
3D-C(CO)NH	(Logan <i>et al.</i> , 1992; Grzesiek <i>et al.</i> , 1993)
3D-H(CCO)NH	
3D-HBHA(CBCACO)NH	(Grzesiek y Bax, 1993)
3D-HCCH-TOCSY	(Kay <i>et al.</i> , 1993)
3D-HCCH-COSY	(Ikura <i>et al.</i> , 1991)
3D- ^1H , ^{15}N -TOCSY-HSQC	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)
2D-HB(CBCDCE)HE	(Yamazaki <i>et al.</i> , 1993)
3. asignaciones de resonancia del ligando no marcado	
^1H -TOCSY filtrado con isótopo 2D	
^1H -COSY filtrado con isótopo 2D	
^1H -NOESY filtrado con isótopo 2D	(Ikura y Bax, 1992)
4. limitaciones estructurales	
<i>en la proteína marcada</i>	
3D- ^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)
4D- ^1H , ^{13}C -HMQC-NOESY-HMQC	(Vuister <i>et al.</i> , 1993)
4D- ^1H , ^{13}C , ^{15}N -HSQC-NOESY-HSQC	(Muhandiram <i>et al.</i> , 1993; Pascal <i>et al.</i> , 1994a)
<i>en el ligando no marcado</i>	
^1H -NOESY filtrado con isótopo 2D	(Ikura y Bax, 1992)
<i>interacciones entre la proteína y el ligando</i>	
^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC filtrado con isótopo 3D	
^1H , ^{13}C -NOESY-HSQC filtrado con isótopo 3D	(Lee <i>et al.</i> , 1994)
5. limitaciones del ángulo dihédrico	
^1H , ^{15}N -HSQC modulado por J	(Billeter <i>et al.</i> , 1992)
3D-HNHB	(Archer <i>et al.</i> , 1991)

ES 2 301 198 T3

Las asignaciones de la resonancia de ^1H , ^{15}N y ^{13}C del eje central para un monocuerpo se comparan con las de Fn3 natural para evaluar los cambios estructurales en el mutante. Una vez estos datos demuestran que el mutante conserva la estructura global, se lleva a cabo el afinamiento estructural utilizando los datos experimentales de NOE. Debido a que la diferencia estructural de un anticuerpo es de esperar que sea menor, la estructura natural puede utilizarse como modelo inicial después de modificar la secuencia de aminoácidos. Se introducen las mutaciones en la estructura natural por modelado molecular interactivo y a continuación la estructura se minimiza energéticamente utilizando un programa de modelado molecular tal como Quanta (Molecular Simulations). Se afina la estructura de la solución utilizando ciclos de hibridación dinámica simulada (Nilges *et al.*, 1988) en el programa X-PLOR (Brünger, 1992). Por lo general, se calcula un conjunto de cincuenta estructuras. La validez de las estructuras afinadas se confirma calculando un número menor de estructuras a partir de las estructuras iniciales generadas al azar en X-PLOR utilizando el protocolo YASAP (Nilges, *et al.*, 1991). Se calcula la estructura de un complejo monocuerpo-ligando afinando en primer lugar ambos componentes individualmente utilizando las NOE intramoleculares y a continuación conectando las dos utilizando las NOE intermoleculares.

Por ejemplo, en la Figura 14 se presenta el espectro ^1H , ^{15}N -HSQC para el monocuerpo LB25.5 que se fija a la fluoresceína. El espectro muestra una buena dispersión (los picos están dispersados) lo que indica que LB25.5 se pliega en una configuración globular. Además, el espectro se parece al del Fn3 natural, lo que demuestra que la estructura total de LB25.5 es similar a la del Fn3. Estos resultados demuestran que pueden obtenerse monocuerpos que se fijan al ligando sin cambiar el pliegue global del andamio de Fn3.

Se llevan a cabo experimentos de perturbación del desplazamiento químico formando el complejo entre un FnAb marcado con isótopo y un ligando no marcado. Se sigue la formación de un complejo estequiométrico registrando el espectro HSQC. Debido a que el desplazamiento químico es sumamente sensible al medio nuclear, la formación de un complejo normalmente produce cambios de desplazamientos químicos sustanciales para las resonancias de los restos de aminoácidos en la interfase. Los experimentos por RMN editados por el isótopo (2D HSQC y 3D CBCA (CO)NH) se utilizan para identificar las resonancias que son perturbadas en el componente marcado del complejo; es decir, el monocuerpo. Aunque debe considerarse siempre la posibilidad de productos artificiales debidos a cambios de configuración de amplitud larga, lo más probable es que surjan diferencias sustanciales para los restos agrupados en superficies continuas de contactos directos (Chen *et al.*, 1993; Gronenborn y Clore, 1993).

Un procedimiento alternativo para cartografiar la superficie de interacción utiliza mediciones del intercambio amida-hidrógeno (HX). Los índices HX para cada protón de amida se miden para el monocuerpo marcado con ^{15}N tanto libre como acoplado con un ligando. Es de esperar que la fijación al ligando dé como resultado índices HX de amida disminuidos para los restos de monocuerpo en la interfase entre las dos proteínas, identificando de este modo la superficie de fijación. Los índices HX para los monocuerpos en el complejo se miden permitiendo que se produzca HX durante un tiempo variable después de la transferencia del complejo a D_2O ; el complejo se disocia rebajando el pH y se registra el espectro HSQC a bajo pH al que el HX de la amida es lento. Fn3 es estable y soluble a bajo pH, satisfaciendo el prerrequisito para los experimentos.

Ejemplo XVI

Construcción y análisis del sistema de expresión en Fn3 específico para la ubiquitina

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

Se realizó la construcción del gen y la expresión en el fago de Fn3 como en los Ejemplos I y II anteriores. La proteína de fusión Fn3-fago pIII se expresó en el vector de expresión en el fagómido, mientras que los demás componentes del fago M13, incluyendo la pIII natural, se produjeron utilizando un fago cooperador (Bass *et al.*, 1990). De este modo, un fago producido por este sistema contendría menos de una copia de la Fn3 expresada en la superficie. La expresión en la superficie de Fn3 en el fago se detectó por ELISA utilizando un anticuerpo anti-Fn3. Solamente los fagos que contenían el vector de fusión Fn3-pIII reaccionaron con el anticuerpo.

Después de confirmar la superficie del fago para expresar Fn3, se construyó un banco de expresión en el fago de Fn3 como en el Ejemplo III. Se introdujeron secuencias aleatorias en los bucles BC y FG. En el primer banco, se introdujeron al azar cinco restos (77 a 81) y se eliminaron tres restos (82 a 84) del bucle FG. La eliminación pretendía reducir la flexibilidad y mejorar la afinidad de fijación del bucle FG. Se introdujeron también al azar cinco restos (26 a 30) en el bucle BC con objeto de proporcionar una mayor superficie de contacto con la molécula diana. De este modo, el banco resultante contiene cinco restos al azar en cada uno de los bucles BC y FG (Tabla 6). Este banco contenía aproximadamente 10^8 clones independientes.

Cribado del banco

Se llevó a cabo el cribado del banco utilizando ubiquitina como molécula diana. En cada ronda de selección por afinidad, los fagos con Fn3 fueron absorbidos en una superficie recubierta con ubiquitina, y los fagos unidos se eluyeron competitivamente con ubiquitina soluble. La relación de recuperación mejoró desde $4,3 \times 10^{-7}$ en la segunda ronda hasta $4,5 \times 10^{-6}$ en la quinta ronda, lo que sugiere un enriquecimiento de clones para fijación. Después de cinco rondas de selección por afinidad, se determinaron las secuencias de aminoácidos de cada uno de los clones (Tabla 6).

ES 2 301 198 T3

TABLA 6

Secuencias en los bucles variegados de clones enriquecidos

5

Denominación	Bucle BC	Bucle FG	Frecuencia
Natural	GCAGTTACCGTGCGT (SEC. ID. nº: 93) AlaValThrValArg (SEC. ID. nº: 94)	GGCCGTGGTGACAGCCCAGCGAGC (SEC. ID. nº: 95) GlyArgGlyAspSerProAlaSer (SEC. ID. nº: 96)	-
Banco ^a	NNKNNKNNKNNKNNK X X X X X	NNKNNKNNKNNKNNK----- X X X X X (eliminación)	-
clon 1 (Ubi4)	TCGAGGTTGCGGCGG (SEC. ID. nº: 97) SerArgLeuArgArg (SEC. ID. nº: 98)	CCGCCGTGGAGGGTG (SEC. ID. nº: 99) ProProTrpArgVal (SEC. ID. nº: 100)	9
clon 2	GGTCAGCGAACTTTT (SEC. ID. nº: 101) GlyGlnArgThrPhe (SEC. ID. nº: 102)	AGGCGGTGGTGGGCT (SEC. ID. nº: 103) ArgArgTrpTrpAla (SEC. ID. nº: 104)	1
clon 3	GCGAGGTGGACGCTT (SEC. ID. nº: 105) AlaArgTrpThrLeu (SEC. ID. nº: 106)	AGGCGGTGGTGGTGG (SEC. ID. nº: 107) ArgArgTrpTrpTrp (SEC. ID. nº: 108)	1

35

^a N indica una mezcla equimolar de A, T, G y C; K indica una mezcla equimolar de G y T.

40

Un clon, denominado Ubi4, dominaba el grupo enriquecido de variantes de Fn3. Por consiguiente, la investigación posterior se centró en este clon Ubi4. Ubi4 contiene cuatro mutaciones en el bucle BC (se conservó Arg 30 en el bucle BC) y cinco mutaciones y tres deleciones en el bucle FG. De este modo, el 13% (12 de cada 94) de los restos se alteraron en Ubi4 de la secuencia natural.

45

La Figura 15 presenta un análisis por ELISA en el fago de Ubi4. El fago Ubi4 se une a la molécula diana, ubiquitina, con afinidad significativa, mientras que un fago que expresa el dominio de Fn3 natural o una fase con moléculas no expresadas presenta poca fijación detectable a ubiquitina (Figura 15a). Además, el fago Ubi4 mostraba un nivel algo elevado de fijación de fondo en la superficie de referencia que carece de recubrimiento de ubiquitina. Unos experimentos por ELISA de competencia demuestran que la IC₅₀ (concentración del ligando libre que produce el 50% de inhibición de la fijación) de la reacción de fijación es aproximadamente 5 μM (Fig. 15b). BSA, ribonucleasa A bovina y citocromo C presentan poca inhibición de la reacción de fijación de Ubi4 a ubiquitina (Fig 15c), lo que indica que la reacción de fijación de Ubi4 a ubiquitina no procede de la fijación específica.

50

Caracterización de una proteína de Fn3 mutante

55

El sistema de expresión proporcionó 50 a 100 mg de proteína de Fn3 por litro de cultivo. Un nivel similar de la expresión de la proteína se observó para el clon Ubi4 y otras proteínas de Fn3 mutantes.

60

Ubi4-Fn3 se expresó como proteína independiente. Aunque una mayoría de Ubi4 se expresó en *E. coli* como proteína soluble, se observó que su solubilidad estaba significativamente reducida en comparación con la de Fn3 natural. Ubi4 era soluble hasta ~20 μM a pH bajo, con mucha menos solubilidad a pH neutro. Esta solubilidad no fue lo bastante elevada para la caracterización estructural detallada utilizando espectroscopia de RMN o cristalografía de rayos X.

65

La solubilidad de la proteína Ubi4 se mejoró añadiendo una cola de solubilidad, GKKGK, como extensión C-terminal. El gen para Ubi4-Fn3 se subclonó en el vector de expresión pAS45 utilizando la PCR. La etiqueta de solubilización del terminal C, GKKGK, se incorporó en esta etapa. BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen) se transformó con el vector de expresión (pAS45 y sus derivados). Se cultivaron células en medio mínimo M9 y medio M9 enriquecido

ES 2 301 198 T3

con Bactotryptone (Difco) que contenía ampicilina (200 $\mu\text{g/ml}$). Para el marcado isotópico, NH_4Cl con ^{15}N sustituyó en el medio al NH_4Cl no marcado. Se inocularon 500 ml del medio en un matraz con tabique de 2 litros con 10 ml de cultivo de toda la noche y se agitó a 37°C . Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para iniciar la expresión de la proteína cuando se alcanza una D.O. de 600 nm. Se recogieron las células por centrifugación 3 horas después de la adición de IPTG y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su utilización.

Se purificaron las proteínas de la manera siguiente. Se pusieron en suspensión las células en 5 ml/(g de células) de Tris (50 mM, pH 7,6) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mM). Se añadió lisozima de huevo de gallina (Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/ml. Después de incubar la solución durante 30 minutos a 37°C , se expusieron a ultrasonidos tres veces durante 30 segundos en hielo. Estos residuos se eliminaron por centrifugación. Se añadió cloruro sódico concentrado a la solución a una concentración final de 0,5 M. Se aplicó la solución a una columna de quelación Hi-Trap (Pharmacia) precargada con níquel y equilibrada en tampón Tris que contenía cloruro sódico (0,5 M). Después de lavar la columna con el tampón, se eluyó histag-Fn3 con el tampón que contenía imidazol 500 mM. La proteína se continuó purificando utilizando una columna ResourceS (Pharmacia) con un gradiente de NaCl en un tampón de acetato sódico (20 mM, pH 4,6).

Con la cola GKKGK (SEC. ID. n°: 109), la solubilidad de la proteína Ubi4 aumentó hasta más de 1 mM a pH bajo y hasta $\sim 50 \mu\text{M}$ a pH neutro. Por consiguiente, se realizaron más análisis en Ubi4 con esta extensión C-terminal (en lo sucesivo denominada Ubi4-K). Se ha publicado que la solubilidad de un minicuerpo podría mejorarse significativamente mediante la adición de tres restos de Lys en los terminales N o C (Bianchi *et al.*, 1994). En el caso de la proteína Rop, una cola con terminal C no estructurada es crítica en el mantenimiento de su solubilidad (Smith *et al.*, 1995).

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

La proteína Ubi4-K conservó una afinidad de fijación a la ubiquitina como se interpreta por ELISA (Figura 15d). Sin embargo, fracasó un intento de determinar la constante de disociación utilizando un biosensor (Affinity Sensors, Cambridge, U.K.) debido a la fijación de fondo elevada de Ubi4-K-Fn3 a la matriz del sensor. Esta matriz está constituida principalmente por dextrano, coherente con la observación de los investigadores de que las interacciones entre Ubi4-K interactúa con el dextrano reticulado de la columna de exclusión por tamaño.

Ejemplo XVII

Mediciones de la estabilidad de monocuerpos

Se siguieron las reacciones de desplegamiento y replegamiento producidas por hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) midiendo la fluorescencia del triptófano. Se llevaron a cabo experimentos en un espectrofluorómetro AB-2 de Spectronic equipado con una jeringuilla accionada por motor (Hamilton Co.). La temperatura de la cubeta se mantuvo a 30°C . El espectrofluorómetro y la jeringuilla se controlaron mediante un solo ordenador utilizando una interfase doméstica. Este sistema registra automáticamente una serie de espectros después de la valoración de GuHCl . Un experimento partió de 1,5 ml de solución de tampón que contenía $5 \mu\text{M}$ de proteína. Se registró un espectro de emisión (300-400 nm; excitación a 290 nm) a continuación de un retraso (de 3 a 5 minutos) después de cada inyección (50 ó 100 μl) de una solución tampón que contenía GuHCl . Estas etapas se repitieron hasta que el volumen de solución alcanzó la capacidad total de una cubeta (3,0 ml). Las intensidades de fluorescencia se normalizaron como relaciones a la intensidad en un punto isofluorescente que se determinó en experimentos por separado. Las curvas de desplegamiento se ajustaron con un modelo de dos estados utilizando una rutina no lineal de mínimos cuadrados (Santoro y Bolen, 1988). Se observaron diferencias no significativas entre los experimentos con tiempos de retardo (entre una inyección y el comienzo de la adquisición del espectro) de 2 minutos y 10 minutos, lo que indica que las reacciones de desplegamiento/replegamiento se alcanzaron cerca de un equilibrio a cada punto de concentración en los tiempos de retardo utilizados.

Se midió la estabilidad de la configuración de Ubi4-K utilizando el procedimiento de desplegamiento producido por GuHCl descrito anteriormente. Se realizaron mediciones en dos series de condiciones; en primer lugar a pH 3,3 en presencia de cloruro sódico 300 mM, donde Ubi4-K es muy soluble, y en segundo lugar en TBS, que se utilizó para el cribado del banco. En ambas condiciones, la reacción de desplegamiento fue reversible, y los investigadores no detectaron signos de acumulación o de desplegamiento irreversible. La Figura 16 presenta las transiciones de desplegamiento de Ubi4-K y de Fn3 natural con la etiqueta $(\text{his})_6$ del terminal N y la etiqueta de la solubilidad del terminal C. La estabilidad de Fn3 natural no fue significativamente afectada por la adición de estas etiquetas. En la Tabla 7 se listan los parámetros que caracterizan las transiciones de desplegamiento.

TABLA 7

Parámetros de estabilidad de Ubi4 y Fn3 natural determinados por el desplegamiento producido por GuHCl

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

ΔG_0 es la energía libre de desplegamiento en ausencia de desnaturante; m_G es la dependencia de la energía libre de desplegamiento en la concentración de GuHCl. Para las condiciones de la solución, véase el encabezamiento de la Figura 4.

Aunque las mutaciones introducidas en los dos bucles disminuyeron ciertamente la estabilidad de Ubi4-K en comparación con Fn3 natural, la estabilidad de Ubi4 permanece comparable a la de una proteína globular "típica". Debe indicarse también que las estabilidades de las proteínas natural y Ubi4-K fueron mayores a pH 3,3 que a pH 7,5.

La proteína Ubi4 tenía una solubilidad significativamente reducida en comparación con la de Fn3 natural, pero la solubilidad se mejoró mediante la adición de una cola de solubilidad. Ya que los dos bucles mutados comprenden las únicas diferencias entre las proteínas naturales y Ubi4, estos bucles deben ser el origen de la solubilidad reducida. En este punto, no está claro si la agregación de Ubi4-K es producida por las interacciones entre los bucles o por las interacciones entre los bucles y las zonas invariables del andamio de Fn3.

La proteína Ubi4-K conservó el pliegue global de Fn3, demostrando que este andamio puede adaptar un gran número de mutaciones en los dos bucles ensayados. Aunque la estabilidad de la proteína Ubi4-K es significativamente inferior a la de la proteína Fn3 natural, la proteína Ubi4 todavía tiene una estabilidad de configuración comparable a la de las pequeñas proteínas globulares. La utilización de un dominio muy estable como andamio es claramente ventajosa para introducir mutaciones sin afectar el pliegue global del andamio. Además, el desplegamiento producido por GuHCl de la proteína Ubi4 es casi completamente reversible. Esto permite la preparación de una proteína plegada correctamente aun cuando un mutante de Fn3 se exprese en una forma malplegada, como en los cuerpos de inclusión. La modesta estabilidad de Ubi4 en las condiciones utilizadas para la identificación del banco indica que las variantes de Fn3 están plegadas en la superficie del fago. Esto sugiere que un clon de Fn3 se selecciona por su afinidad de fijación en la forma plegada, no en una forma desnaturada. Dickinson *et al.* propusieron que Val 29 y Arg 30 en el bucle BC estabilizan a Fn3. Val 29 hace contacto con el núcleo hidrófobo y Arg 30 forma enlaces de hidrógeno con Gly 52 y Val 75. En Ubi4-Fn3, Val 29 está sustituido por Arg, mientras que se conserva Arg 30. El bucle FG se mutó también en el banco. Este bucle es flexible en la estructura natural, y presenta una gran variación en la longitud entre los dominios Fn3 humanos (Main *et al.*, 1992). Estas observaciones sugieren que las mutaciones en el bucle FG pueden tener menos impacto sobre la estabilidad. Además, la cola en el terminal N de Fn3 es adyacente a la superficie molecular formada por los bucles BC y FG (Figuras 1 y 17) y no forma una estructura bien definida. Las mutaciones en la cola del terminal N no es de esperar que tengan efectos perjudiciales fuertes sobre la estabilidad. Por lo tanto, los restos en la cola N-terminal pueden ser puntos adecuados para introducir mutaciones adicionales.

Ejemplo XVIII

50 *Espectroscopia de RMN de Ubi4-Fn3*

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

La estructura tridimensional de Ubi4-K se caracterizó utilizando este método de espectroscopia de RMN heteronuclear. Pudo recogerse un espectro de gran calidad en una solución 1 mM de Ubi4 marcada con ¹⁵N (Figura 17a) a bajo pH. La anchura de la línea de los picos amídicos de Ubi4-K fue similar a la de la Fn3 natural, lo que sugiere que Ubi4-K es monomérico en las condiciones utilizadas. Las asignaciones completas para los núcleos ¹H y ¹⁵N del eje central se consiguieron utilizando técnicas de doble resonancia ¹H y ¹⁵N habituales, excepto para una fila de restos

de His en la etiqueta (His)₆ del terminal N. Había unos picos muy débiles en el espectro HSQC que parecía que se originaban a partir de una especie menor que contiene el resto Met N-terminal. El análisis de espectroscopia de masas demostró que una mayoría de Ubi4-K no contiene el resto Met N-terminal. La Fig. 17 presenta las diferencias en los desplazamientos químicos de ¹HN y ¹⁵N entre Ubi4-K y Fn3 natural. Se observan pequeñas solamente diferencias en los desplazamientos químicos, excepto para los que están en los bucles BC y FG mutados y cerca de ellos. Estos resultados indican claramente que Ubi4-K conserva el pliegue global de Fn3, a pesar de las mutaciones extensas en los dos bucles. Unos pocos restos en la zona N-terminal, que está próxima a los bucles mutados, presentan también diferencias químicas significativas entre las dos proteínas. Se registró también un espectro HSQC en una muestra de 50 μM de Ubi4-K en TBS. El espectro era similar al recogido a pH bajo, lo que indica que la configuración global de Ubi4 se mantiene entre pH 7,5 y 3,3.

La anterior descripción detallada y los ejemplos se han proporcionado solamente para claridad de la comprensión. Ninguna limitación innecesaria debe desprenderse de los mismos. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, las variaciones que resultan evidentes para un experto en la materia estarán incluidas dentro de la invención definida en las reivindicaciones.

Referencias

- Alzari, P.N., Lascombe, M.-B. & Poljak, R.J. (1988)** Three-dimensional structure of antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 555-580.
- Archer, S. J., Ikura, M., Torchia, D. A. & Bax, A. (1991)** An alternative 3D NMR technique for correlating backbone ¹⁵N with side chain H β resonances in large proteins *J. Magn. Reson.* 95, 636-641.
- Aukhil, I., Joshi, P., Yan, Y. & Erickson, H. P. (1993)** Cell -and heparin- binding domains of the hexabrachion arm identified by tenascin expression protein *J. Biol. Chem.* 268, 2542-2553.
- Barbas, C. F., III, Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J. (1991)** Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7978-7982.
- Barbas, C. F., III, Bain, J. D., Hoekstra, D. M. & Lerner, R. A. (1992)** Semisynthetic combinatorial libraries: A chemical solution to the diversity problem *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4457-4461.
- Baron, M., Main, A. L., Driscoll, P. C., Mardon, H. J., Boyd, J. & Campbell, I.D. (1992)** ¹H NMR assignment and secondary structure of the cell adhesion type II module offibronectin *Biochemistry* 31, 2068-2073.
- Baron, M., Norman, D. G. & Campbell, I. D. (1991)** *Protein modules Trends Biochem. Sci.* 16, 13-17.
- Bass, S., Greene, R. & Wells, J. A. (1990)** Hormone phage: An enrichment method for variant proteins with altered binding properties *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 8, 309-314.
- Bax, A. & Grzesiek, S. (1993)** Methodological advances in protein NMR. *Acc. Chem. Res.* 26, 131-138.
- Becktel, W. J. & Schellman, J. A. (1987)** Protein stability curves. *Biopolymer* 26, 1859-1877.
- Bhat, T. N., Bentley, G. A., Boulot, G., Greene, M. I., Tello, D., Dall'acqua, W., Souchon, H., Schwarz, F. P., Mariuzza, R. A. & Poljak, R. J. (1994)** Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1089-1093.
- Bianchi, E., Venturini, S., Pessi, A., Tramontano, A. & Sollazzo, M. (1994)** High level expression and rational mutagenesis of a designed protein, the minibody. From an insoluble to a soluble molecule. *J. Mol. Biol.* 236, 649-659.
- Billeter, M., Neri, D., Otting, G., Qian, Y. Q. & Wüthrich, K. (1992)** Precise vicinal coupling constants ³JHNa in proteins from nonlinear fits of J-modulated [¹⁵N, ¹H]-COSY experiments. *J. Biomol. NMR* 2, 257-274.
- Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. (1980)** Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 69, 185-189.
- Bork, P. & Doolittle, R. F., PNAS** 89:8990-8994 (1992).
- Bork, P. & Doolittle, R. F. (1992)** Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8990-8994.
- Bork, P., Hom, L. & Sander, C. (1994)** The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* 242, 309-320.
- Brünger, A. T. (1992)** X-PLOR (Version 3.1): A system for X-ray crystallography and NMR., Yale Univ. Press, New Haven.

ES 2 301 198 T3

- Burke, T., Bolger, R., Checovich, W. & Lowery, R. (1996)** in Phage display of peptides and proteins (Kay, B. K., Winter, J. and McCafferty, J., Ed.) Vol. págs. 305-326, *Academic Press*, San Diego.
- Campbell, I. D. & Spitzfaden, C. (1994)** Building proteins with fibronectin type III modules *Structure* 2, 233-337.
- Chen, Y., Reizer, J., Saier, M. H., Fairbrother, W. J. & Wright, P. E. (1993)** Mapping the binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIAGlc. *Biochemistry* 32, 32-37.
- Clackson & Wells, (1994)** *Trends Biotechnology* 12, 173-184.
- Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1991)** Structure of larger proteins in solution: Three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* 252, 1390-1399.
- Corey, D. R., Shiau, A. K., Q., Y., Janowski, B. A. & Craik, C. S. (1993)** Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene* 128, 129-134.
- Davies, J. & Riechmann, L. (1996)**. Single antibody domains as small recognition units: design and *in vitro* antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein Eng.*, 9(6), 531-537.
- Davies, J. & Riechmann, L. (1995)** Antibody VH domains as small recognition units. *Bio/Technol.* 13, 475-479.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A. (1995)** NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-293.
- Deng, W. P. & Nickoloff, J. A. (1992)** Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200, 81-88.
- deVos, A. M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A. A. (1992)** Human Growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.
- Dickinson, C. D., Veerapandian, B., Dai, X.P., Hamlin, R. C., Xuong, N.-H., Ruoslahti, E. & Ely, K. R. (1994)** Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin *J. Mol. Biol.* 236, 1079-1092.
- Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M. E. & Friguier, B. (1996)** in Antibody Engineering, A Practical Approach (Mc-Cafferty, J., Hoogenboom, H. R. and Chiswell, D. J., Ed.) Vol. páginas 77-97, Oxford Univ. Press, Oxford.
- Dougall, W. C., Peterson, N. C. & Greene, M. I. (1994)** Antibody-structure-based design of pharmacological agents. *Trends Biotechnol.* 12, 372-379.
- Garrett, D. S., Powers, R., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1991)** A common sense approach to peak picking in two-, three- and four-dimensional spectra using automatic computer analysis of contour diagrams. *J. Magn. Reson.* 95, 214-220.
- Ghosh, G., Van Duyne, G., Ghosh, S. & Sigler, P. B. (1995)** Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site. *Nature* 373, 303-310.
- Gribkov, M., Devereux, J. & Burgess, R. R. (1984)** The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nuc. Acids. Res.* 12, 539-549.
- Gronenborn, A. M., Filpula, D. R., Essig, N. Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P. T. & Clore, G. M. (1991)** A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of Streptococcal protein G. *Science* 253, 657-661.
- Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1993)** Identification of the contact surface of a Streptococcal protein G domain complexed with a human Fc fragment. *J. Mol. Biol.* 233, 331-335.
- Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A. (1993)** Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins by isotropic mixing of ^{13}C magnetization. *J. Magn. Reson.* B 101, 114-119.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1992)** Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6291-6293.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1993)** Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J. Biomol. NMR* 3, 185-204.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988)** Antibodies. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*.

ES 2 301 198 T3

- Harpez, Y. & Chothia, C. (1994)** Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains *J. Mol. Biol.* 238, 528-539.
- 5 **Hawkins, R. E., Russell, S. J., Baier, M. & Winter, G. (1993)** The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. The interaction of mutant D1.3 antibodies with lysozyme. *J. Mol. Biol.* 234, 958-964.
- Holliger, P. et al., (1993)** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6444-6448.
- 10 **Hu, S-z., et al., Cancer Res.** 56:3055-3061 (1996).
- Ikura, M. & Bax, A. (1992)** Isotope-filtered 2D NMR of a protein-peptide complex: study of a skeletal muscle myosin light chain kinase fragment bound to calmodulin. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2433-2440.
- 15 **Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A. (1991)** Improved three-dimensional 1H-13C-1H correlation spectroscopy of a 13C-labeled protein using constant-time evolution. *J. Biomol. NMR* 1, 299-304.
- Jacobs, J. & Schultz, P. G. (1987)** Catalytic antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2174-2176.
- 20 **Janda, K. D., et al.; Science** 275:945-948 (1997).
- Jones, E. Y. (1993)** The immunoglobulin superfamily *Curr. Opinion struct. Biol.* 3, 846-852.
- 25 **Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. (1986)** Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse *Nature* 321, 522-525.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983)** Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- 30 **Kay, L. E. (1995)** Field gradient techniques in NMR spectroscopy. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 5,674-681.
- Kay, L. E., Keifer, P. & Saarinen, T. (1992)** Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665.
- 35 **Kay, L. E., Xu, G.-Y. & Singer, A. U. (1993)** A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain 1H and 13C Correlations in H2O Samples of Proteins. *J. Magn. Reson. B* 101, 333-337.
- Koide, S., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (1993)** Characterization of a folding intermediate of apoplastcyanin trapped by proline isomerization. *Biochemistry* 32, 12299-12310.
- 40 **Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pederson, K. & Baralle, F. E. (1985)** Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene *EMBO J.* 4, 1755-1759.
- 45 **Kraulis, P. (1991)** MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl. Cryst.* 24, 946-950.
- Kunkel, T. A. (1985)** Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492.
- 50 **Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I. & Erickson, H. P. (1992)** Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein *Science* 258, 987-991.
- Lee, W., Revington, M. J., Arrowsmith, C. & Kay, L. E. (1994)** A pulsed field gradient isotope-filtered 3D 13C HMQCNOESY experiment for extracting intermolecular NOE contacts in molecular complexes. *FEBS lett.* 350, 87-90.
- 55 **Lerner, R. A. & Barbas III, C. F., Acta Chemica Scandinavica,** 50 672-678 (1996).
- 60 **Lesk, A. M. & Tramontano, A. (1992)** Antibody structure and structural predictions useful in guiding antibody engineering. In *Antibody engineering. A practical guide.* (Borrebaeck, C. A. K., Ed.) Vol. W. H. Freeman & Co., Nueva York.
- Li, B., Tom, J. Y., Oare, D., Yen, R., Fairbrother, W. J., Wells, J. A. & Cunningham, B. C. (1995)** Minimization of a polypeptide hormone *Science* 270, 1657-1660.
- 65 **Litvinovich, S. V., Novokhatny, V. V., Brew, S. A. & Ingham, K. C. (1992)** Reversible unfolding of an isolated heparin and DNA binding fragment, the first type III module from fibronectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1119, 57-62.

ES 2 301 198 T3

- Logan, T. M., Olejniczak, E. T., Xu, R. X. & Fesik, S. W. (1992)** Side chain and backbone assignments in isotopically labeled proteins from two heteronuclear triple resonance experiments. *FEBS lett.* 314, 413-418.
- Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. & Campbell, I. D. (1992)** The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* 71, 671-678.
- Masat, L., et al., (1994)** PNAS 91:893-896.
- Martin, F., Toniatti, C., Ciliberto, G., Cortese, R. & Sollazzo, M. (1994)** The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. *EMBO J.* 13, 5303-5309.
- Martin, M. T.,** *Drug Discov. Today*, 1:239-247 (1996).
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. (1990)** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McConnell, S. J., & Hoess, R. H.,** *J. Mol. Biol.* 250:460-470 (1995).
- Metzler, W. J., Leiting, B., Pryor, K., Mueller, L. & Farmer, B. T. I. (1996)** The three-dimensional solution structure of the SH2 domain from p55blk kinase. *Biochemistry* 35, 6201-6211.
- Minor, D. L. J. & Kim, P. S. (1994)** Measurement of the β -sheet-forming propensities of amino acids. *Nature* 367, 660-663.
- Muhandiram, D. R., Xu, G. Y. & Kay, L. E. (1993)** An enhanced-sensitivity pure absorption gradient 4D ¹⁵N, ¹³C edited NOESY experiment. *J. Biomol. NMR* 3, 463-470.
- Müller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L. & Harrison, S. C. (1995)** Structure of the NH-kB p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373, 311-117.
- Nilges, M., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1988)** Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations. *FEBS lett.* 229, 317-324.
- Nilges, M., Kuszewski, J. & Brünger, A. T. (1991)** in Computational aspects of the study of biological macromolecules by nuclear magnetic resonance spectroscopy. (Hoch, J. C., Poulsen, F. M. and Redfield, C., Ed.) Vol. páginas 451-455, *Plenum Press*, Nueva York.
- O'Neil et al., (1994)** en Techniques in Protein Chemistry V (Crabb, L., ed.) páginas 517-524, *Academic Press*, San Diego.
- O'Neil, K. T. & Hoess, R. H. (1995)** Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 5, 443-449.
- Pace, C. N., Shirley, B. A. & Thomson, J. A. (1989)** Measuring the conformational stability of a protein. In Protein structure. A practical approach (Creighton, T. E., Ed.) Vol. páginas 311-330, IRL Press, Oxford.
- Parmley, S. F. & Smith, G. P. (1988)** Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes *Gene* 73, 305-318.
- Pascal, S. M., Muhandiram, D. R., Yamazaki, T., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E. (1994a)** Simultaneous acquisition of ¹⁵N- and ¹³C-edited NOE spectra of proteins dissolved in H₂O. *J. Magn. Reson. B* 103, 197-201.
- Pascal, S. M., Singer, A. U., Gish, G., Yamazaki, T., Shoelson, S. E., Pawson, T., Kay, L. E. & Forman-Kay, J. D. (1994b)** Nuclear magnetic resonance structure of an SH2 domain of phospholipase C-g1 complexed with a high affinity binding peptide. *Cell* 77, 461-472.
- Pessi, A., Bianchi, E., Cramer, A., Venturini, S., Tramontano, A. & Sollazzo, M. (1993)** A designed metal-binding protein with a novel fold. *Nature* 362, 367-369.
- Rees, A. R., Staunton, D., Webster, D. M., Searle, S. J., Henry, A. H. & Pedersen, J. T. (1994)** Antibody design: beyond the natural limits. *Trends Biotechnol.* 12, 199-206.
- Roberts et al., (1992)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2429-2433.
- Rosenblum, J. S. & Barbas, C. F. I. (1995)** en Antibody Engineering (Borrenbaeck, C. A. K., Ed.) Vol. Páginas 89-116, Oxford University Press, Oxford.

ES 2 301 198 T3

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: A laboratory manual, 2^o Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*.
- 5 **Sandhu, G. S., Aleff, R. A. & Kline, B. C. (1992)** Dual asymmetric PCR: one-step construction of synthetic genes. *BioTech.* 12, 14-16.
- Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988)** Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants *Biochemistry* 27, 8063-8068.
- 10 **Smith, G. P. & Scott, J. K. (1993)** Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 217, 228-257.
- Smith, G. P. (1985)** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- 15 **Smith, C. K., Munson, M. & Regan, L. (1995).** Studying α -helix and β -sheet formation in small proteins. *Techniques Prot. Chem.*, 6, 323-332.
- 20 **Smith, C. K., Withka, J. M. & Regan, L. (1994)** A thermodynamic scale for the β -sheet forming tendencies of the amino acids. *Biochemistry* 33, 5510-5517.
- Smyth, M. L. & von Itzstein, M. (1994)** Design and synthesis of a biologically active antibody mimic based on an antibody-antigen crystal structure. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 2725-2733.
- 25 **Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990)** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
- Suzuki, H. (1994)** Recent advances in abzyme studies. *J. Biochem.* 115, 623-628.
- 30 **Tello, D., Goldbaum, F. A., Mariuzza, R. A., Ysern, X., Schwarz, F. P. & Poljak, R. J. (1993)** Immunoglobulin superfamily interactions. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 943-946.
- Thomas, N. R. (1994)** Hapten design for the generation of catalytic antibodies. *Appl. Biochem. Biotech.* 47, 345-372.
- 35 **Verhoeyen, M., Milstein, C. & Winter, G. (1988)** Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity. *Science* 239, 1534-1536.
- 40 **Venturini et al., (1994)** *Protein Peptide Letters* 1, 70-75.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1992)** Resolution enhancement and spectral editing of uniformly ¹³C-enriched proteins by homonuclear broadband ¹³C decoupling. *J. Magn. Reson.* 98, 428-435.
- 45 **Vuister, G. W., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Powers, R., Garrett, D. S., Tschudin, R. & Bax, A. (1993)** Increased resolution and improved spectral quality in four-dimensional ¹³C/¹³C-separated HMQC-NOESY-HMQC spectra using pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.* B 101, 210-213.
- Ward, E. S., Güssow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T. & Winter, G. (1989)** Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli* *Nature* 341, 554-546.
- 50 **Webster, D. M., Henry, A. H. & Rees, A. R. (1994)** Antibody-antigen interactions *Curr. Opinion Struct. Biol.* 4, 123-129.
- 55 **Williams, A. F. & Barclay, A. N., Ann. Rev. Immunol.** 6:381-405 (1988).
- Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. (1993)** Antibody-antigen interactions. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 3, 113-118.
- Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. (1994)** Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes *Curr. Opinion Struct Biol.* 4, 857-867.
- 60 **Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. & Hoogenboom, H. R. (1994)** Making antibodies by phage display technology *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455.
- 65 **Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L.-N. (1989)** Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biolchem.* 179, 131-137.

ES 2 301 198 T3

Wittenkind, M. & Mueller, L. (1993) HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha- and beta-carbon resonances in proteins *J. Magn. Reson. B* 101, 201-205.

5 **Wu, T. T., Johnson, G. & Kabat, E. A. (1993)** Length distribution of CDRH3 in antibodies *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 16, 1-7.

Wüthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley & Sons, Nueva York.

10 **Yamazaki, T., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E. (1993)** Two-Dimensional NMR Experiments for Correlating ¹³C-beta and ¹H-delta/epsilon Chemical Shifts of Aromatic Residues in ¹³C-Labeled Proteins via Scalar Couplings. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11054.

15 **Zhang, O., Kay, L. E., Olivier, J. P. & Forman-Kay, J. D. (1994)** Backbone ¹H and ¹⁵N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *J. Biomol. NMR* 4, 845-858.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Monocuerpo de polipéptido fibronectina tipo III (Fn3), que comprende una mayoría de secuencias de dominio Fn3 con cadena β que están unidos a una pluralidad de secuencias de la zona del bucle, en el que una o más de las secuencias de la zona del bucle del monocuerpo varían por eliminación, inserción o sustitución de por lo menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias de la zona del bucle correspondientes en Fn3 natural, y es capaz de unirse a un acompañante de fijación específica (SBP) para formar un complejo péptido:SBP o un compuesto análogo en estado de transición (TSAC).

2. Monocuerpo según la reivindicación 1, en el que Fn3 comprende el 10° dominio de tipo III de la fibronectina humana.

3. Monocuerpo según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que por lo menos una zona del bucle del monocuerpo es capaz de unirse a un acompañante de fijación específica (SBP) para formar un complejo polipéptido:SBP, que tiene una constante de disociación inferior a 10^{-6} moles/litro.

4. Monocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que por lo menos una zona del bucle del monocuerpo es capaz de catalizar una reacción química con una constante de la proporción catalizada (k_{cat}) y una constante de la proporción no catalizada, (k_{unecat}), de tal modo que la relación k_{cat}/k_{unecat} es mayor de 10.

5. Monocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que una o más de las zonas del bucle comprenden los restos de aminoácidos siguientes:

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

6. Monocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que una o más de las zonas del bucle comprenden los bucles FG y/o BC, según se define en la reivindicación 5.

7. Monocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las secuencias de la zona del bucle del monocuerpo varían de las secuencias de la zona del bucle de la Fn3 natural por la eliminación o sustitución de por lo menos 2 aminoácidos.

8. Monocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las secuencias de la zona del bucle del monocuerpo varían en las secuencias de la zona del bucle de la Fn3 natural por inserción de por lo menos 3 a 25 aminoácidos.

9. Procedimiento de preparación de un monocuerpo polipeptídico de fibronectina tipo III (Fn3) según cualquier reivindicación anterior, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar una secuencia de ADN que codifica una pluralidad de las secuencias del dominio de la cadena β de Fn3 que están ligadas a una pluralidad de las secuencias de la zona del bucle en la que por lo menos una zona del bucle contiene un único punto de la enzima de restricción;

(b) escindir la secuencia de ADN en el único punto de restricción;

(c) insertar en el punto de restricción un segmento de ADN que codifica un péptido capaz de unirse a un ligando, tal como un acompañante de fijación específica (SBP) o a un compuesto análogo del estado de transición (TSAC), a fin de proporcionar ADN que comprende el segmento y la secuencia de ADN de (a); y

(d) expresar la molécula de ADN para proporcionar el monocuerpo polipeptídico.

10. Procedimiento de preparación de un monocuerpo polipeptídico de fibronectina tipo III (Fn3) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas siguientes:

a) proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de las secuencias de dominio de la cadena β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la zona del bucle, en la que se conoce la secuencia nucleotídica de por lo menos una zona del bucle;

ES 2 301 198 T3

- b) preparar cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) suficientemente complementarios con la secuencia del bucle conocida a fin de que sean hibridables en las condiciones de la PCR, conteniendo por lo menos uno de los cebadores contiene una secuencia de ácido nucleico modificada que ha de insertarse en el ADN;
- 5 c) llevar a cabo la PCR utilizando la secuencia de ADN de (a) y los cebadores de (b);
- d) hibridar y ampliar los productos de la reacción de (c) a fin de proporcionar un producto de ADN; y
- 10 e) expresar el monocuerpo polipeptídico codificado por el producto de ADN de (d).
11. Procedimiento de preparación de un monocuerpo polipeptídico de fibronectina tipo III (Fn3) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas siguientes:
- 15 (a) proporcionar una secuencia de ADN replicable que codifica una pluralidad de las secuencias del dominio de la cadena β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la zona del bucle, en la que se conoce la secuencia nucleotídica de por lo menos una zona del bucle;
- 20 (b) llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio de por lo menos una zona del bucle a fin de crear una secuencia de ADN que comprende una mutación por inserción; y
- (c) expresar el monocuerpo polipeptídico codificado por la secuencia de ADN que comprende una mutación por inserción.
- 25 12. Secuencia de ácido nucleico, tal como una secuencia de ADN, que codifica un monocuerpo polipeptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. Secuencia de ácido nucleico, que comprende una secuencia variable de 6 a 75 bases de ácido nucleico insertadas en cualquiera de las zonas del bucle de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12.
- 30 14. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13, que se construye a fin de evitar uno o más codones que codifican la cisteína o el codón de terminación.
15. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14, en la que la secuencia variable de ácido nucleico está situada en el bucle AB.
- 35 16. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14, en la que la secuencia variable de ácido nucleico está situada en el bucle BC.
17. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14, en la que la secuencia variable de ácido nucleico está situada en el bucle CD.
- 40 18. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14, en la que la secuencia variable de ácido nucleico está situada en el bucle DE.
- 45 19. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14, en la que la secuencia variable de ácido nucleico está situada en el bucle EF.
20. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14, en la que la secuencia variable de ácido nucleico está situada en el bucle FG.
- 50 21. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en la que las secuencias del dominio de la cadena β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la zona del bucle comprende la SEC. ID. n°: 111.
- 55 22. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en la que las secuencias del dominio de la cadena β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la zona del bucle comprende la SEC. ID. n°: 114.
23. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, en la que una o más de las secuencias de la zona del bucle del monocuerpo comprende RYDR, que son las bases 5 a 9 de la SEC. ID. n°: 1.
- 60 24. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, en la que una o más de las secuencias de la zona del bucle del monocuerpo comprende AVVSYY, que son las bases 4 a 9 de la SEC. ID. n°: 2.
- 65 25. Vector de expresión que comprende un casete de expresión funcionalmente ligado a una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24.
26. Vector de expresión según la reivindicación 25, que comprende un plásmido basado en el fago M13.

ES 2 301 198 T3

27. Vector de expresión según la reivindicación 25, que comprende un plásmido basado en el fago fUSE5/fd.

28. Célula hospedadora que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27.

5 29. ADN replicable que codifica una pluralidad de secuencias de dominio de la cadena β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la zona del bucle para su utilización en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

10 30. Banco de ácidos nucleicos variable que codifica monocuerpos polipeptídicos de Fn3, que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24.

31. Procedimiento de preparación de un banco variable de ácidos nucleicos según la reivindicación 30 que comprende las etapas siguientes:

15 (a) preparar un monocuerpo polipeptídico de Fn3 que tiene una secuencia predeterminada;

(b) poner en contacto el polipéptido con un acompañante de fijación específico (SBP) para formar un complejo polipéptido:SBP en el que la constante de disociación de dicho complejo polipéptido:SBP es inferior a 10^{-6} moles/litro;

20 (c) determinar la estructura de fijación del complejo polipéptido:SBP por espectroscopia de resonancia magnética nuclear o por cristalografía de rayos X; y

25 (a) preparar el banco variable de ácidos nucleicos, en el que la variación se realiza en las posiciones en la secuencia de ácido nucleico que, a partir de la información proporcionada en (c), da como resultado uno o más polipéptidos que mejoran la fijación al SBP.

32. Procedimiento de preparación de un banco variable según la reivindicación 30, que comprende las etapas siguientes:

30 (a) preparar un monocuerpo polipeptídico de Fn3 que presenta una secuencia predeterminada, en el que el polipéptido es capaz de catalizar una reacción química con una constante de la proporción catalizada, (k_{cat}), y una constante de la proporción no catalizada, (k_{unecat}), de tal modo que la relación k_{cat}/k_{unecat} es mayor de 10;

35 (b) poner en contacto el polipéptido con un compuesto análogo del estado de transición (TSAC) inmovilizado o separable que representa el estado de transición molecular aproximado de la reacción química;

(c) determinar la estructura de fijación del complejo polipéptido:TSAC por espectroscopia de resonancia magnética nuclear o por cristalografía de rayos X; y

40 (d) preparar el banco variable de ácidos nucleicos, en el que la variación se realiza en las posiciones en la secuencia de ácido nucleico que, a partir de la información proporcionada en (c), produce uno o más polipéptidos que mejoran la fijación al TSAC o la estabilización del mismo.

45 33. Banco de expresión del péptido derivado de un banco variable de ácido nucleico según la reivindicación 30.

34. Banco de expresión del péptido según la reivindicación 33, en el que el péptido se expresa en la superficie de un bacteriófago o virus.

50 35. Banco de expresión del péptido según la reivindicación 34, en el que el bacteriófago es M13 o fd.

36. Procedimiento de identificación de la secuencia de aminoácidos de una molécula polipeptídica capaz de unirse a un acompañante de fijación específica (SBP) a fin de formar un complejo polipéptido:SBP, en el que la constante de disociación de dicho complejo polipéptido:SBP es inferior a 10^{-6} moles/litro, que las etapas siguientes:

55 a) proporcionar un banco de expresión en péptidos de la invención según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32;

b) poner en contacto el banco de expresión en péptidos de (a) con SBP;

60 c) separar el complejo péptido:SBP del péptido libre;

d) proporcionar la replicación del péptido separado de (c) a fin de que produzca un nuevo banco de expresión en el péptido que se distingue de ésta en (a) por tener una diversidad reducida y por estar enriquecida en los péptidos expresados capaces de unirse al SBP;

65 e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c) y (d) con el nuevo banco de (d); y

ES 2 301 198 T3

f) determinar la secuencia de ácidos nucleicos de la zona que codifica el péptido expresado de una especie procedente de (d) y deducir la secuencia de aminoácidos capaz de unirse al SBP.

5 37. Procedimiento de identificación de la secuencia de aminoácidos de una molécula de polipéptido capaz de catalizar una reacción química con una constante de la proporción catalizada, (k_{cat}), y una constante de la proporción no catalizada, (k_{uncat}), de tal modo que la relación k_{cat}/k_{uncat} es mayor de 10, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar un banco de expresión en péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32;

10 (b) poner en contacto el banco de expresión en péptidos de (a) con un compuesto análogo del estado de transición (TSAC) que representa el estado de transición molecular aproximado de la reacción química;

(c) separar el complejo péptido:TSAC del péptido libre;

15 (d) producir la replicación de los péptidos separados de (c) a fin de que produzca un nuevo banco de expresión en péptidos que se distingue del de (a) por tener una diversidad reducida y por estar enriquecido en péptidos expresados capaces de unirse al TSAC;

(e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c) y (d) con el nuevo banco de (d); y

20 (f) determinar la secuencia de ácidos nucleicos de la zona que codifica el péptido expresado de una especie de (d) y, por consiguiente, deducir la secuencia peptídica.

38. Procedimiento según la reivindicación 36 ó 37, que comprende asimismo la preparación de dicho polipéptido.

25 39. Utilización de un monocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la identificación y/o selección de ligandos de fijación y/o moléculas diana.

30 40. Utilización según la reivindicación 39 que comprende formar un complejo de dicho monocuerpo y un ligando de fijación y/o una molécula diana y a continuación seleccionar dicho complejo, seleccionando de este modo el ligando de fijación y/o la molécula diana.

35 41. Utilización de un polipéptido de fibronectina tipo III (Fn3) como andamio para injertos de zonas determinantes de complementariedad (CDR).

42. Monocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, capaz de unirse a uno o más de entre: ubiquitina, fluoresceína, digoxigenina y TSAC.

40 43. Utilización de un monocuerpo polipeptídico de fibronectina tipo III (Fn3) que comprende una pluralidad de las secuencias de dominio de la cadena β de Fn3 que están unidas a una pluralidad de secuencias de la zona del bucle, variando una o más de las secuencias de la zona del bucle del monocuerpo por eliminación, inserción o sustitución de por lo menos dos aminoácidos procedentes de las secuencias de la zona del bucle correspondientes en Fn3 natural, como andamio para el reconocimiento molecular o para la modificación genética de las proteínas de fijación.

45

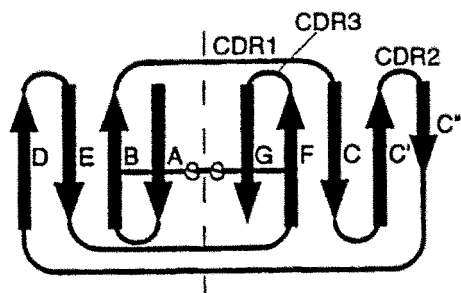
50

55

60

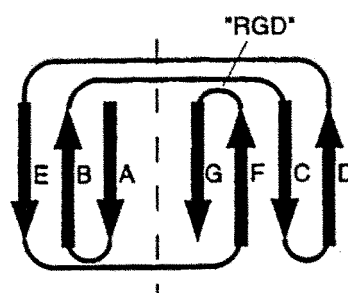
65

FIG. 1A



VH de Inmunoglobulina

FIG. 1B



Fibronectina tipo III

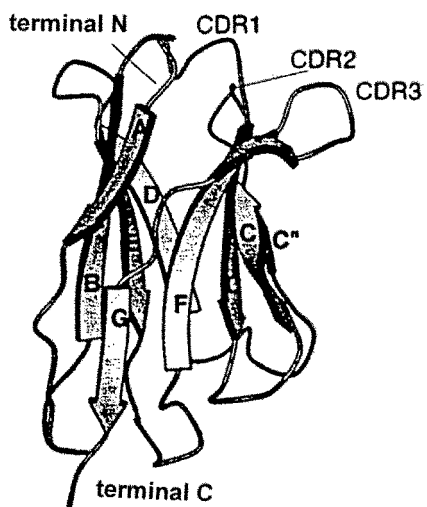


FIG. 1C

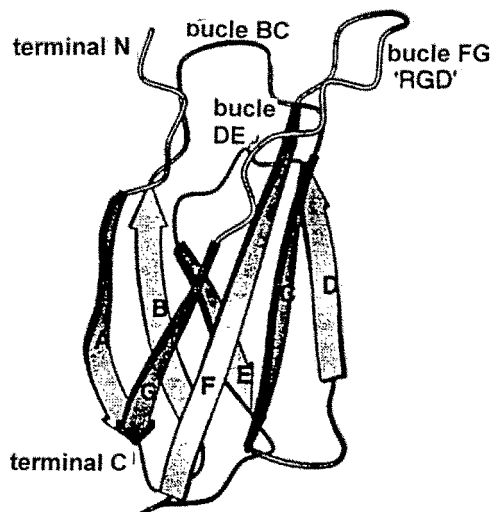


FIG. 1D

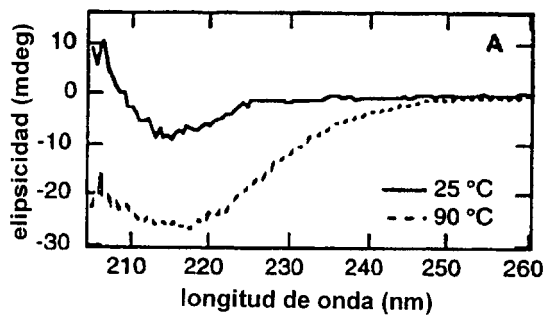


FIG. 3A

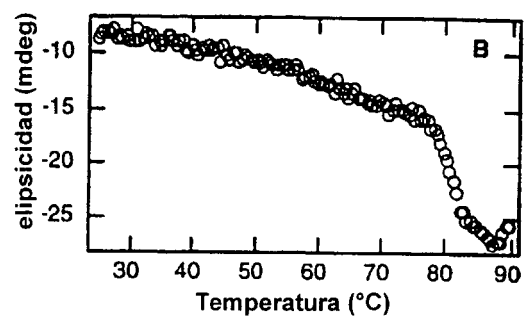


FIG. 3B

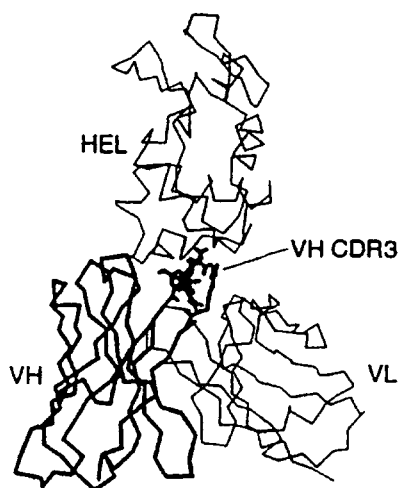


FIG. 4A

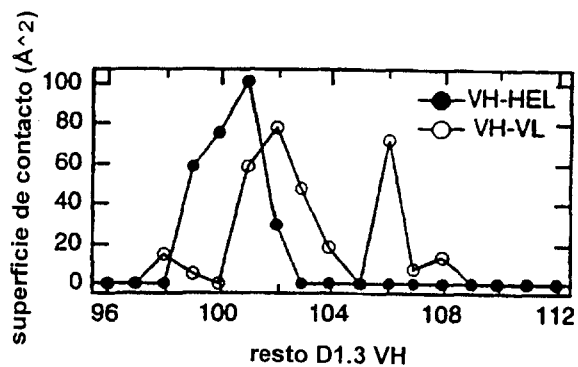


FIG. 4B

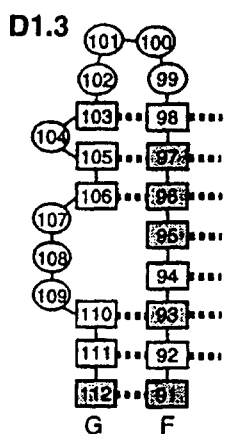


FIG. 4C

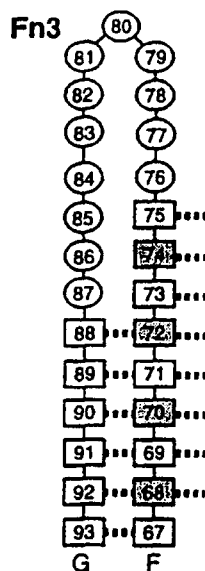


FIG. 4D

ES 2 301 198 T3

NdeI
 CATATGCAGGTTTCTGATGTTCCGCGTGACCTGGAAGTTGTTGCTGCGACCCCGACTAGC
 MetGlnValSerAspValProArgAspLeuGluValValAlaAlaThrProThrSer
 -2 -1 1 10

BclI PvuII PstI BsiWI
 CTGCTGATCAGCTGGGATGCTCCTGCAGTTACCGTGCGTTATTACCGTATCACGTACGGT
 LeuLeuIleSerTrpAspAlaProAlaValThrValArgTyrTyrArgIleThrTyrGly
 20 30

EcoRI
 GAAACCGGTGGTAACTCCCCGGTTCAGGAATTCACCTGTACCTGGTCCAAGTCTACTGCT
 GluThrGlyGlyAsnSerProValGlnGluPheThrValProGlySerLysSerThrAla
 40 50

SalI Bst1107I
 ACCATCAGCGGCCTGAAACCGGGTGTGCGACTATACCATCACTGTATACGCTGTTACTGGC
 ThrIleSerGlyLeuLysProGlyValAspTyrThrIleThrValTyrAlaValThrGly
 60 70

SacI XhoI
 CGTGGTGACAGCCCAGCGAGCTCCAAGCCAATCTCGATTAACCTACCGTACCTAGTAACTC
 ArgGlyAspSerProAlaSerSerLysProIleSerIleAsnTyrArgThr
 80 90

FIG. 5

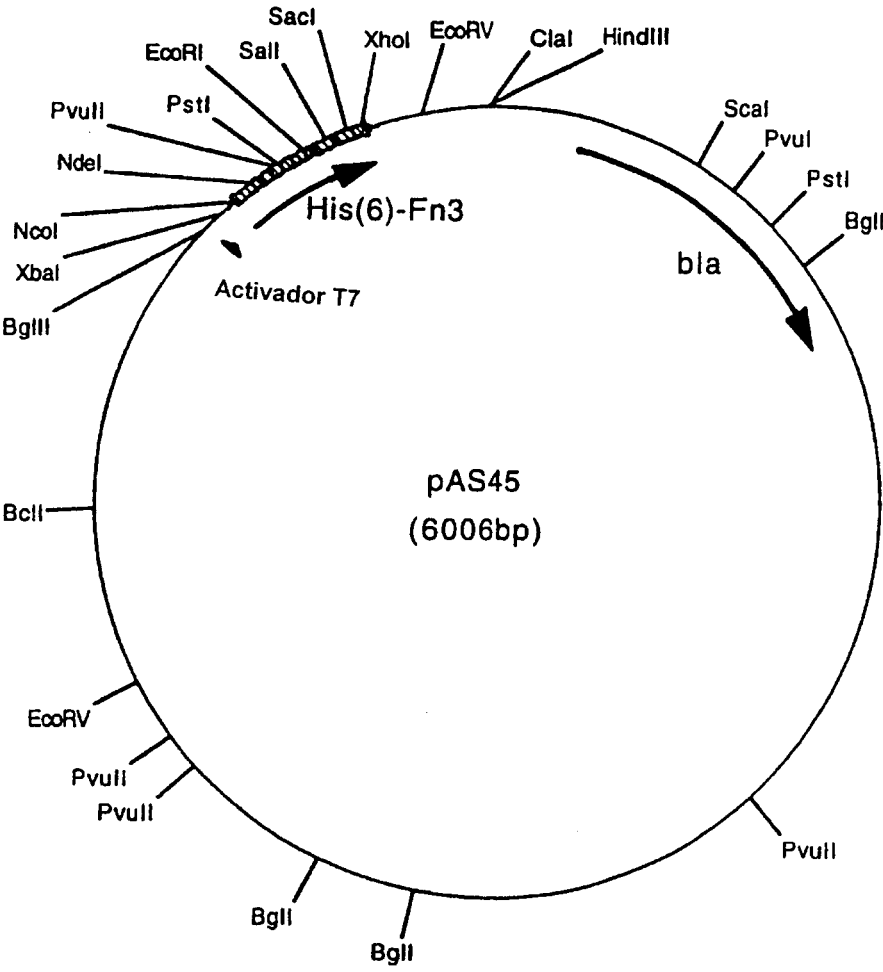


FIG. 6

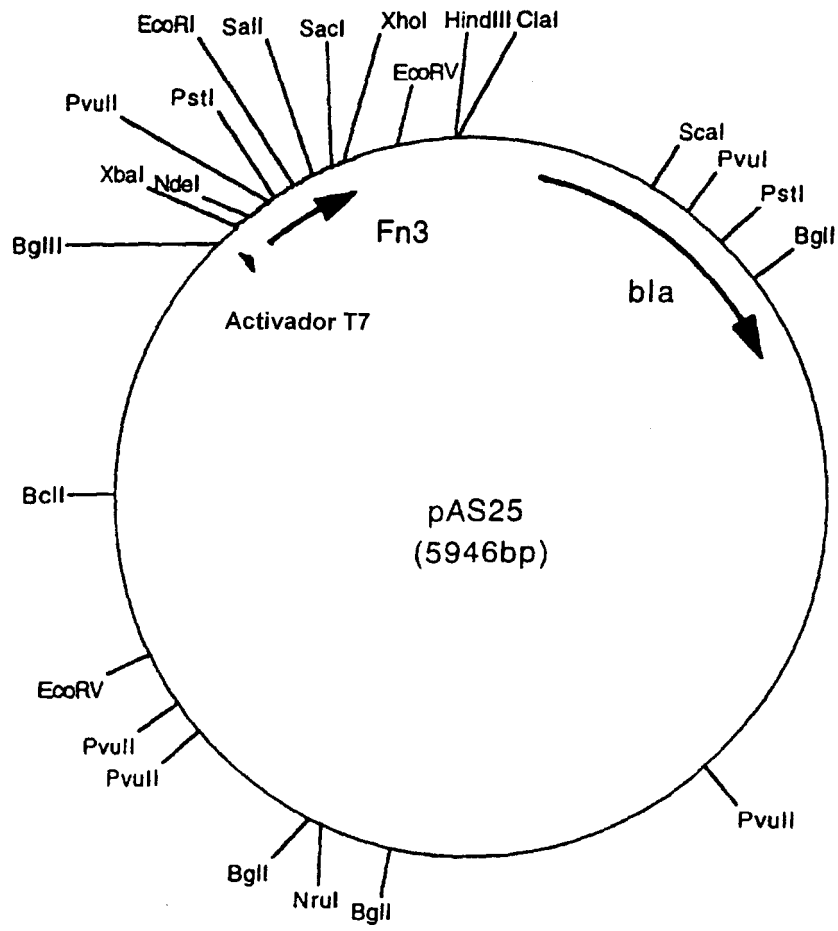


FIG. 7

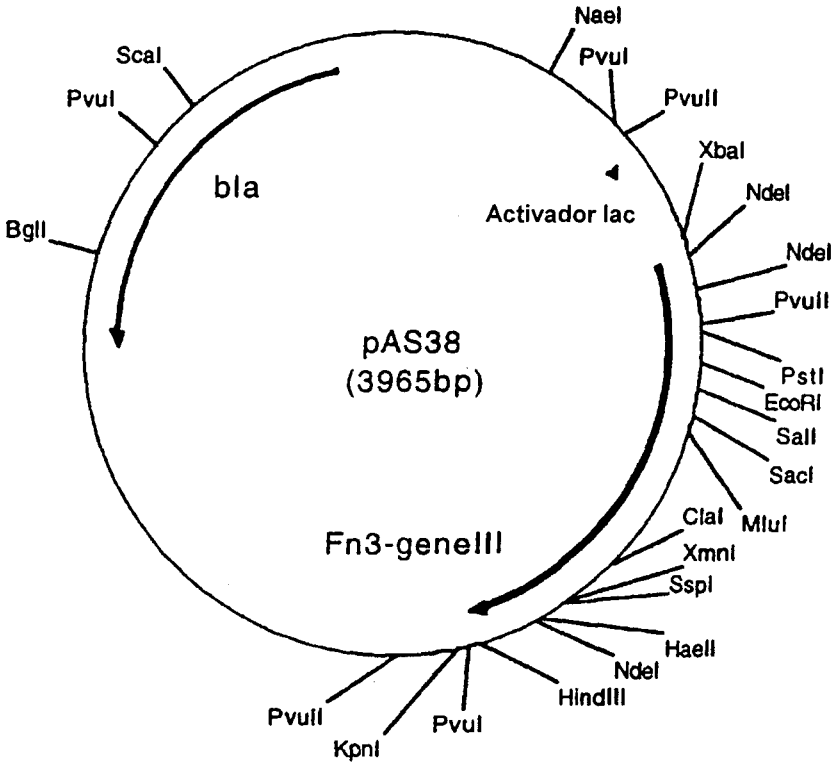


FIG. 8

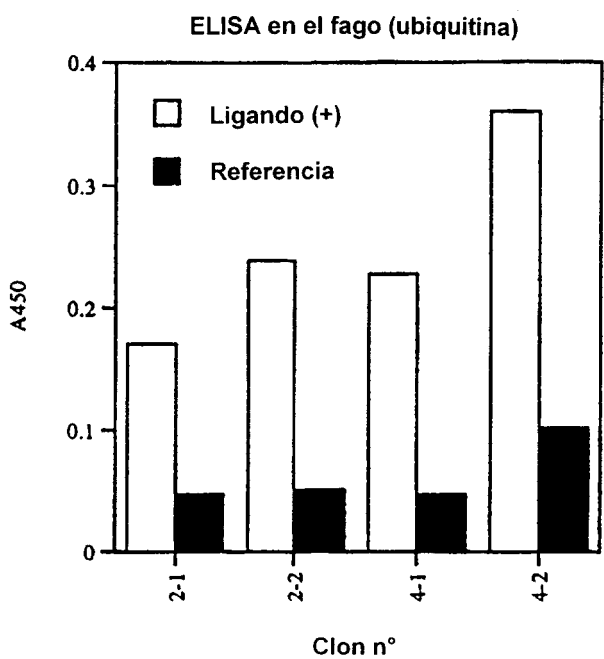


FIG. 9

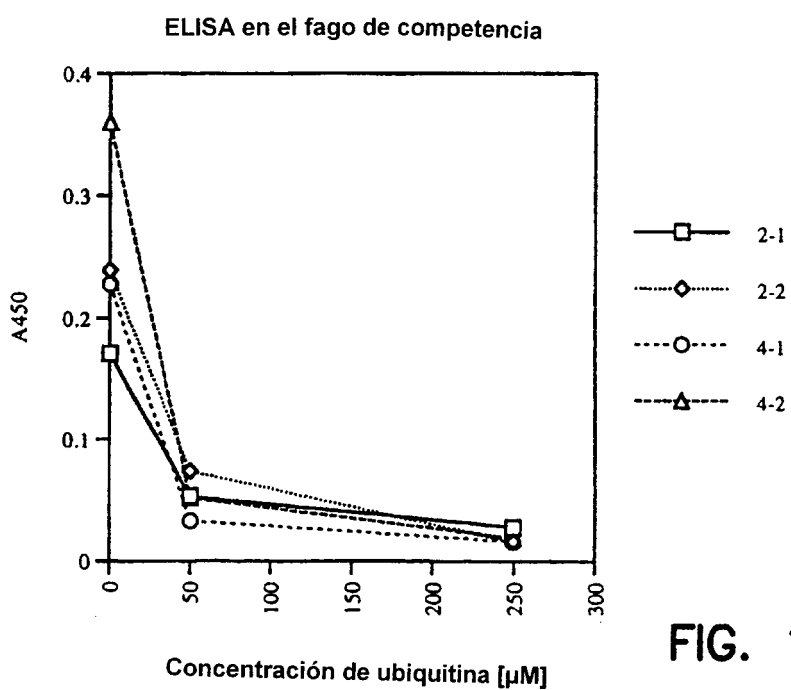


FIG. 10

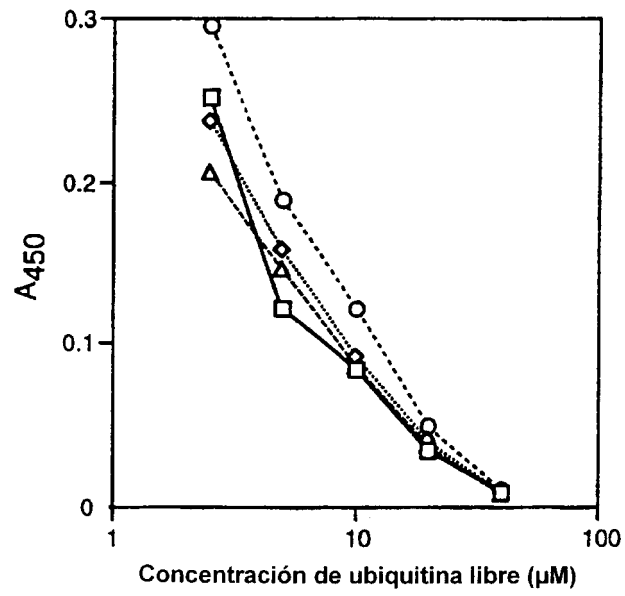


FIG. 11

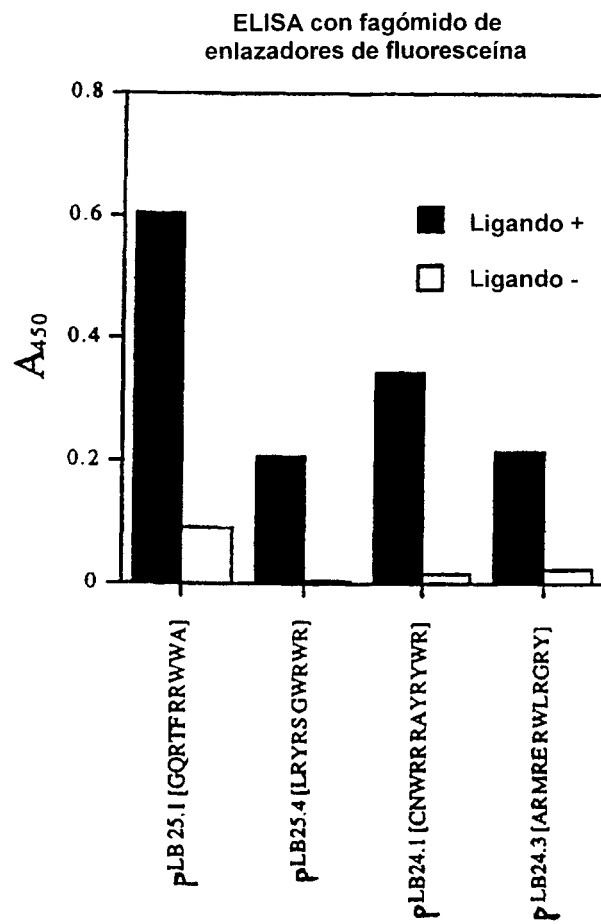


FIG. 12

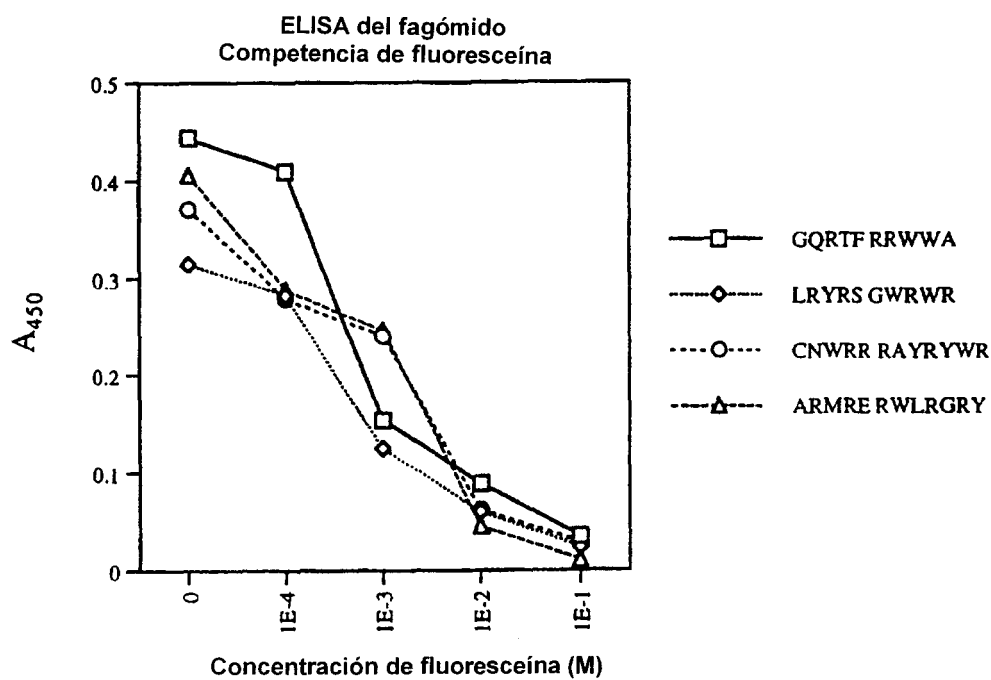


FIG. 13

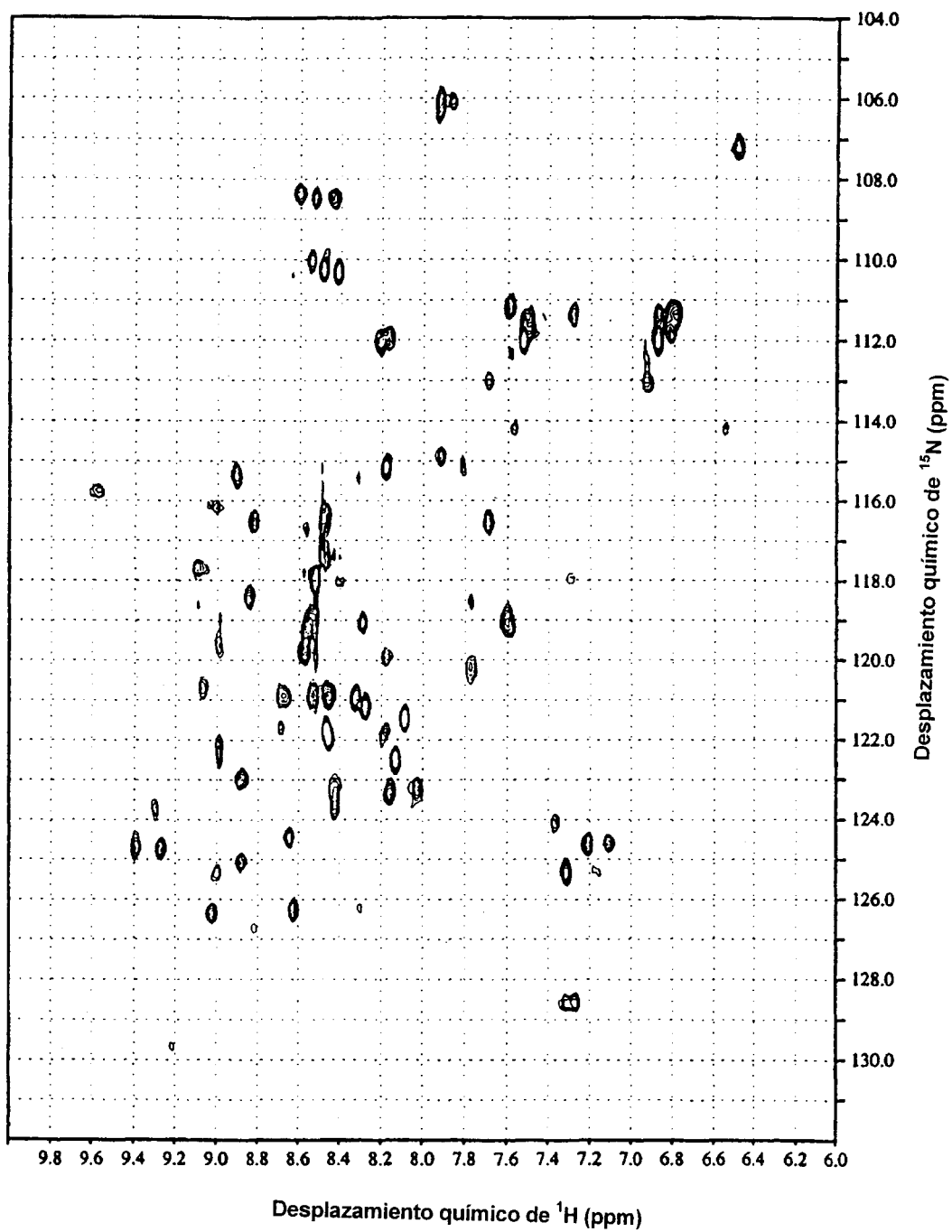


FIG. 14

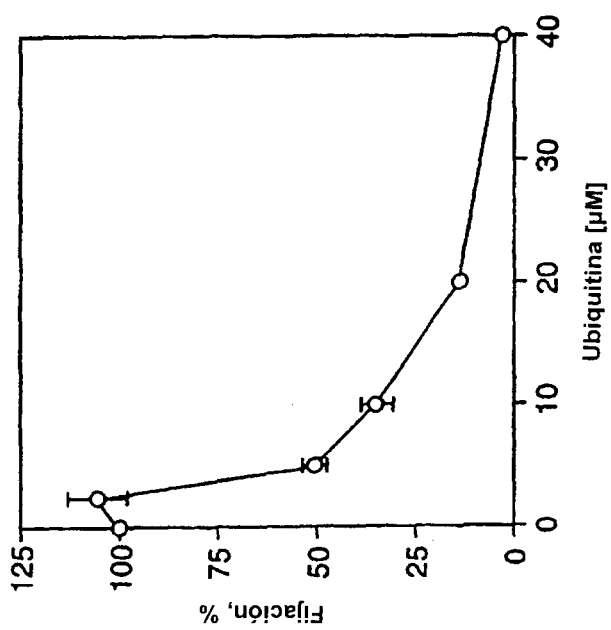


FIG. 15B

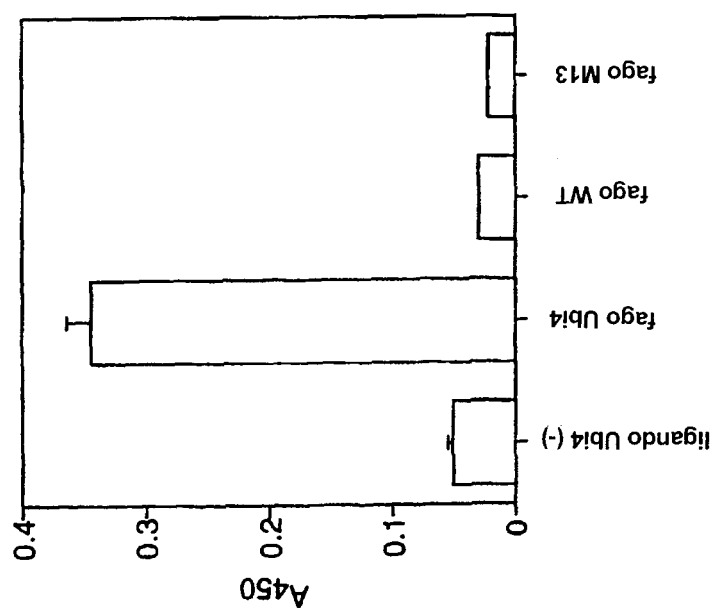


FIG. 15A

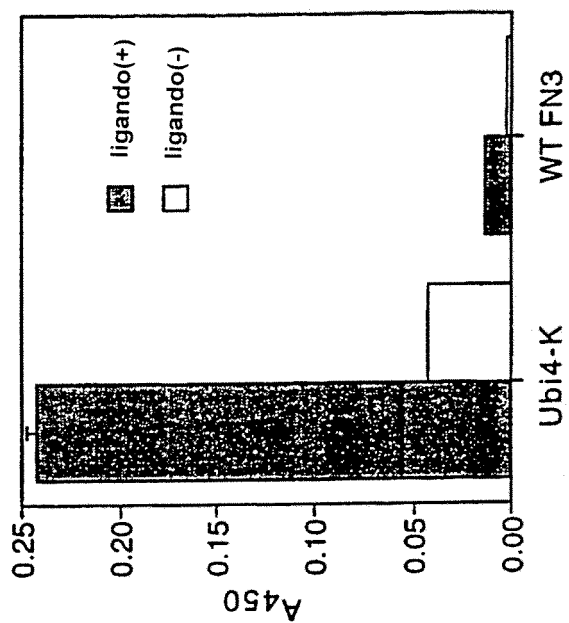


FIG. 15D

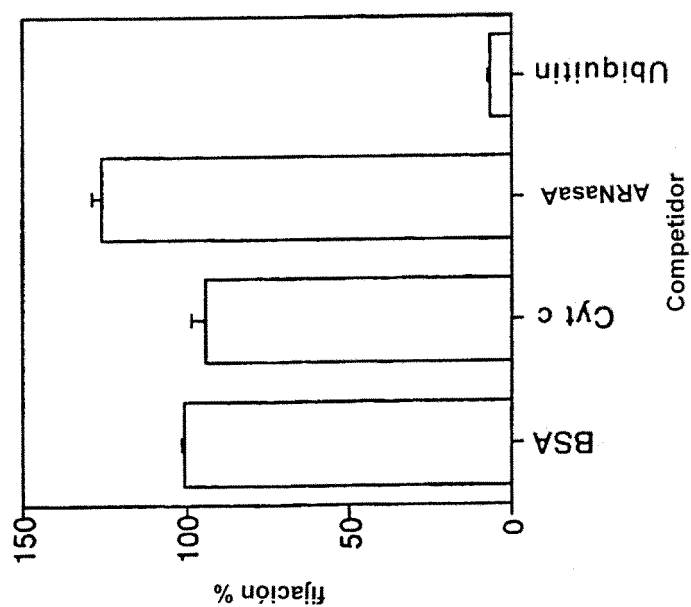


FIG. 15C

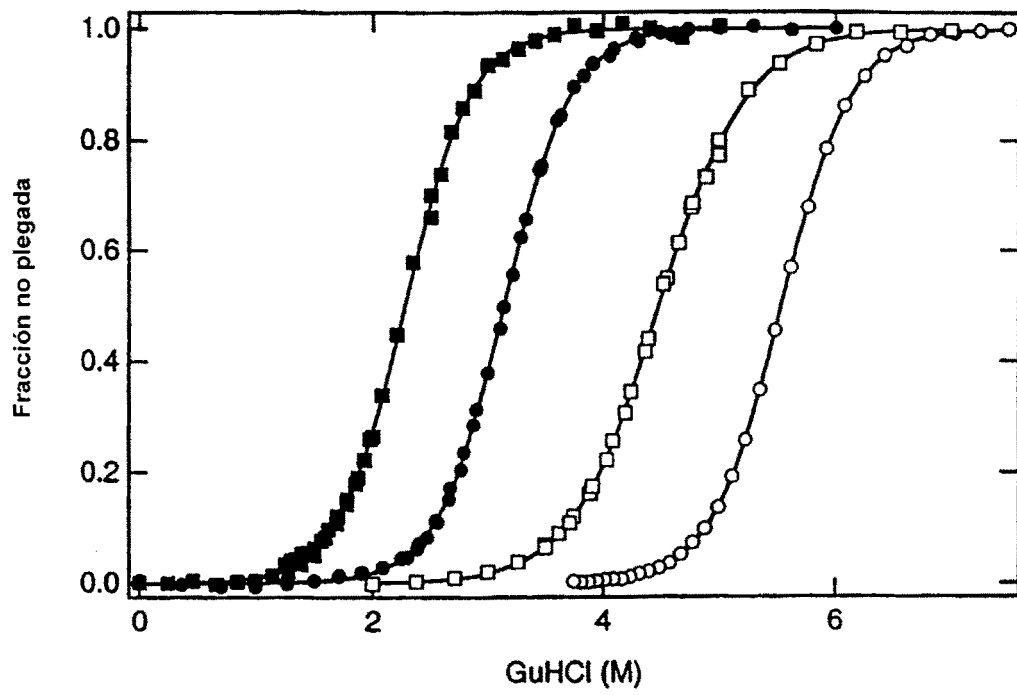


FIG. 16

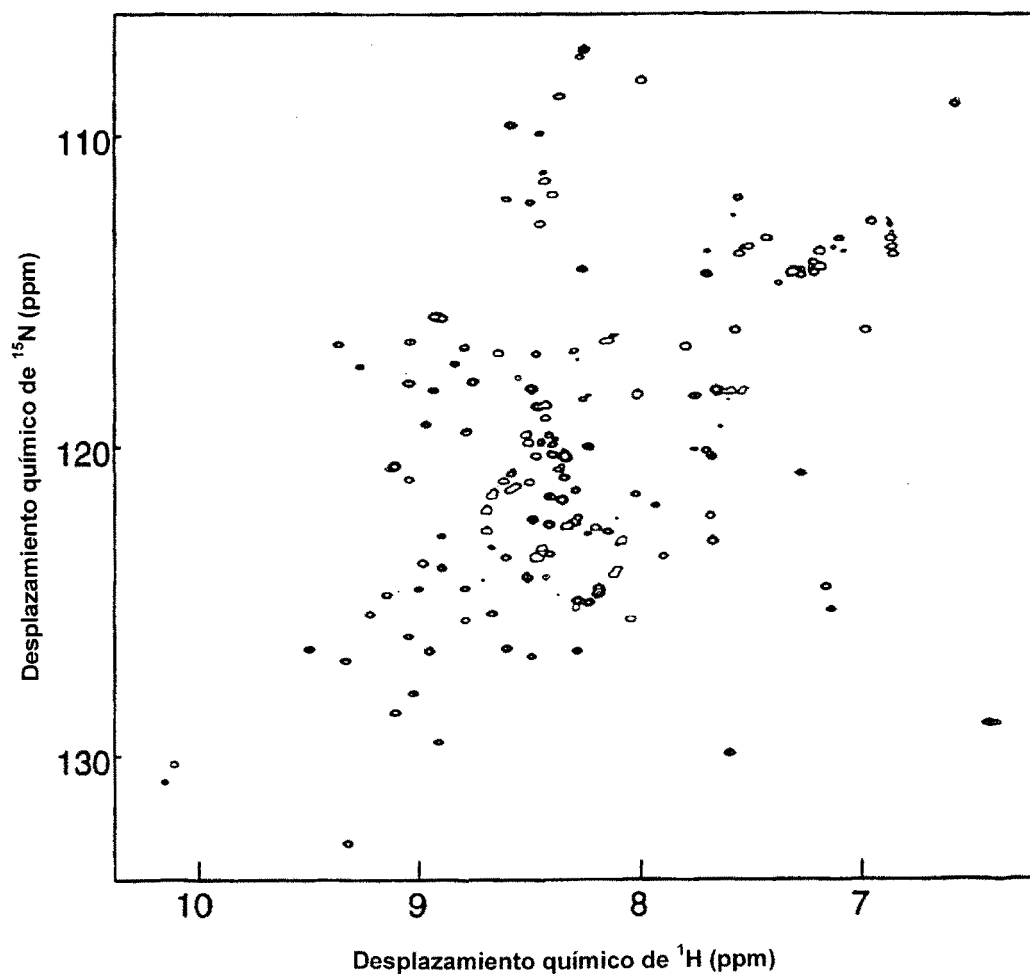


FIG. 17A

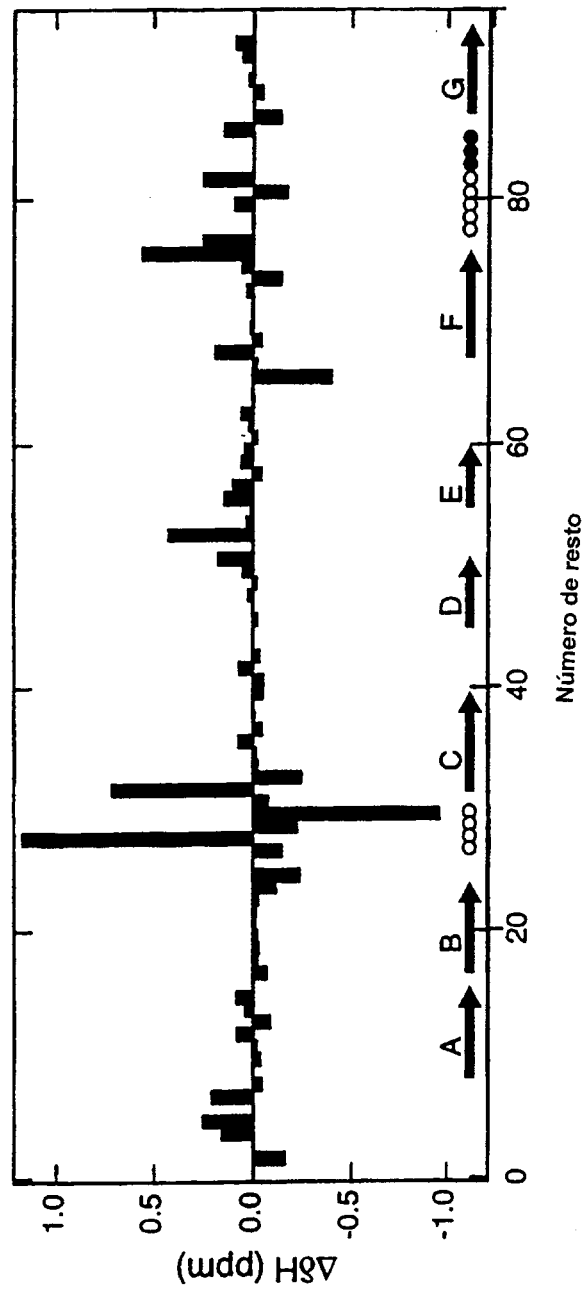


FIG. 17B

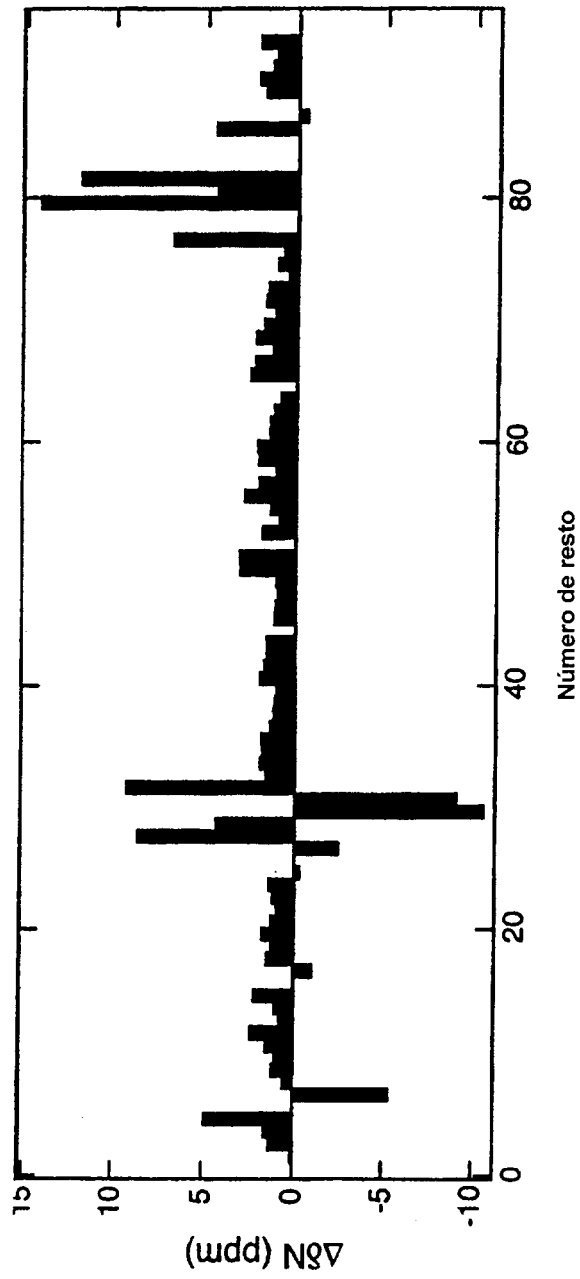


FIG. 17C