



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 285**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01965350 .0**  
86 Fecha de presentación : **24.08.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1311670**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

54 Título: **Procedimiento de mutagénesis dirigida masiva.**

30 Prioridad: **25.08.2000 FR 00 10962**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2007**

73 Titular/es: **Biomethodes  
Genopole Industries, 4, rue Pierre Fontaine  
91000 Evry, FR**

72 Inventor/es: **Delcourt, Marc y  
Blesa, Stéphane**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 282 285 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

Procedimiento de mutagénesis dirigida masiva.

5 La invención se refiere al ámbito de la biología molecular y más concretamente el de la mutagénesis. Tiene por objeto un procedimiento de mutagénesis dirigida altamente productiva, es decir, la constitución de numerosos mutantes dirigidos en un tiempo y un número de etapas reducidos. Por lo tanto este procedimiento será calificado de “mutagénesis masiva”.

10 La mutagénesis es una técnica destinada a modificar artificialmente la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN con el fin de modificar la actividad biológica que origina. La mutagénesis ha tomado esta última década un lugar importante en numerosos trabajos de biología molecular.

El término de mutagénesis se puede asociar a tres modificaciones distintas de un fragmento de ADN:

- 15
- la delección, que consiste en eliminar nucleótidos del fragmento de ADN de interés,
  - la inserción, que consiste en añadir, y

20

  - la sustitución, que consiste en sustituir una o varias bases por el mismo número de bases de diferente naturaleza.

Las técnicas de mutagénesis se pueden separar en dos grandes grupos: la mutagénesis aleatoria por una parte, y la mutagénesis dirigida por otra parte.

25 La mutagénesis aleatoria tiene por objeto introducir sustituciones de naturaleza y de posición aleatorias en un fragmento de ADN. Históricamente, la mutagénesis aleatoria se realizaba por medio de procedimientos químicos que alteraban la estructura del ADN. Más recientemente, la amplificación de una molécula que utiliza una polimerasa en condiciones particulares a menudo sustituyó los procedimientos químicos. Estas condiciones particulares se caracterizan porque alteran las capacidades de la enzima para replicar exactamente el ADN. Ésta introduce al hilo ciclos de las mutaciones, es decir, diferencias con respecto a la secuencia inicial. Al final de la reacción, se obtiene un gran número de copias de la molécula inicial, incluyendo cada una de estas moléculas mutaciones diferentes. Estas moléculas están presentes en forma de un banco, es decir de una mezcla de moléculas de distinta naturaleza (que difiere por la naturaleza y la posición de sus mutaciones).

35 La mutagénesis dirigida tiene por objeto introducir una o algunas mutaciones (sustituciones, pero también delecciones o inserciones) de naturaleza y de posición conocidos en un fragmento de ADN. Se utiliza un oligonucleótido para introducir esta mutación. Este oligonucleótido está constituido clásicamente por una veintena de bases. La secuencia de este oligonucleótido es homóloga en cualquier punto de la secuencia que actúa como diana sobre el fragmento de ADN a excepción de una o de algunas posiciones localizadas en su parte mediana.

40 Este oligonucleótido se utiliza a continuación para activar una reacción de replicación (o de amplificación, es decir, de múltiples replications) utilizando el fragmento de ADN como matriz. La secuencia nuevamente sintetizada contiene la modificación buscada.

45 Las primeras técnicas de mutagénesis dirigida se basaban en la amplificación únicamente del fragmento de ADN de interés (en forma de un fragmento de ADN lineal), que debía a continuación ser introducido en un plásmido. Estas técnicas eran fastidiosas y se debían adaptar a cada sistema de estudio.

50 Más recientemente, el oligonucleótido mutante se utilizó para replicar directamente el plásmido que contiene el fragmento de ADN de interés. Se minimiza así el número de manipulaciones que se deben realizar.

55 La realización práctica de la mutagénesis dirigida está, sin embargo, lejos de ser simple. Se plantea, en particular, el problema del aislamiento de las moléculas que hayan incorporado la mutación con respecto a las moléculas que no la hayan incorporado. La única replicación de un fragmento de ADN circular (que corresponde al caso clásico de un gen clonado en un plásmido) por medio de un oligonucleótido mutante no permite, en ausencia de sistema de selección, observar una tasa de mutagénesis detectable. El ADN sintetizado “*in vitro*” pudiendo ser distinguido del ADN sintetizado en bacterias según el criterio de su contenido en bases metiladas, se puso a punto y se generalizó un sistema de cribado basado en este criterio. Se trata de utilizar la enzima DpnI, específica de sitios presentes sobre el ADN metilado pero no sobre el ADN no metilado (Lacks *et al.*, 1980, *Methods in Enzymology*, 65: 138). Se eliminaron así las moléculas que no habían sido sometidas a replicación “*in vitro*”. Pero incluso al utilizar este sistema de cribado de mutantes, la eficacia de la reacción de mutagénesis sigue siendo baja y cercana a 5% solamente de moléculas mutantes.

65 Esta baja tasa de mutantes se debe, en particular, al hecho de que después de la reacción de mutagénesis dirigida, se introducen las moléculas circulares en bacterias que contienen un sistema de reparación del ADN que elimina una gran parte de las mutaciones si éstas no son llevadas por una de las hebras de ADN.

## ES 2 282 285 T3

Se propusieron numerosos sistemas para intentar mejorar la eficacia de estas técnicas de mutagénesis. Estas técnicas necesitan a menudo un segundo oligonucleótido que permite mejorar la frecuencia de las moléculas mutantes antes del cribado (solicitud de patente europea nº 96942905 y solicitud de patente internacional nº WO 9935281). Otros sistemas utilizan igualmente un segundo oligonucleótido que permite un sistema de cribado particular y a veces más eficaz (solicitud de patente europea nº 0938552, Catálogo Clontech 2000, página 45). Finalmente otros sistemas utilizan cepas bacterianas particulares, estos sistemas teniendo por objeto minimizar la pérdida de rendimiento debida a la actividad reparadora de las bacterias (solicitud de patente de EE.UU. nº 4.873.192 y solicitud de patente europea nº 0938552).

Por último, la mayoría de las técnicas existentes permiten integrar simultáneamente varios oligonucleótidos en una secuencia de ADN. Por regla general, hasta tres oligonucleótidos se pudieron introducir simultáneamente en distintos lugares del fragmento que se debe mutar (solicitud de patente internacional nº WO 9935281 y solicitud de patente europea nº 0938552). Un artículo hace incluso referencia a la obtención de moléculas que simultáneamente hayan integrado hasta siete oligonucleótidos en una única etapa (Perlak *et al.*, 1990, Nucleic Acid Research, 18 : 7457).

El concepto de banco, en la técnica según el estado de la técnica anterior, no se adapta para caracterizar los productos obtenidos al final de una reacción de mutagénesis dirigida. En efecto, en la gran mayoría de los casos, se obtiene un único producto al final de la reacción, conteniendo una única mutación. La solicitud de patente de EE.UU. nº 5.798.208 describe un método de mutagénesis en el cual un aminoácido elegido de antemano se introduce en todas las posiciones posibles de una región seleccionada de una proteína con el fin de producir un banco de mutantes de esta proteína, siendo el objetivo evaluar la función de un aminoácido específico en la estructura o la función de una proteína dada. En los casos en que se introducen varias mutaciones simultáneamente por medio de varios oligonucleótidos (solicitud de patente internacional nº WO 9935281; Perlak *et al.*, 1990, Nucleic Acid Research, 18 : 7457), los únicos productos buscados son los que hayan incorporado la totalidad de las mutaciones, y la técnica tiende a ser optimizada con el objetivo de maximizar la frecuencia de estos productos. Los productos que no hayan incorporado más que una pequeña fracción de las mutaciones se minimizan y están en estas relaciones considerados como productos secundarios.

La mutagénesis puede tener por objetivo la ganancia o la pérdida de una actividad.

La ganancia de una actividad, o más frecuentemente su simple mejora, es especialmente interesantes en los ámbitos de la enzimología o de la asociación ligando/receptor. Así, poder disponer de una enzima de actividad mejorada puede permitir la reducción de los costes de los procedimientos industriales que utilizan estas enzimas. Incluso, la afinidad del enlace entre un ligando y su receptor se puede mejorar gracias a algunas mutaciones localizadas a nivel del sitio de reconocimiento de uno al otro.

La búsqueda de estas mejoras de la actividad se designa a menudo de manera genérica por “evolución molecular”. Se trata de simular la evolución durante las reacciones “*in vitro*”, introduciendo mutaciones en un fragmento de ADN y seleccionando las que tienen actividades mejoradas. Varias vueltas de mutagénesis/selección favorecen así la evolución de una molécula en presencia de una presión selectiva.

El tipo de mutagénesis utilizado más frecuentemente en este contexto es la mutagénesis aleatoria. En efecto, ningún elemento que no permite generalmente definir *a priori* la naturaleza y la posición de las mutaciones susceptibles de aportar una mejora de la actividad estudiada, es necesario en este contexto producir un gran número de moléculas que tienen cada una mutaciones de posición y de naturaleza diferentes, con el fin de maximizar las oportunidades que entre ellas se encuentre una molécula que corresponde a una actividad mejorada.

La pérdida de la actividad biológica asociada a un fragmento de ADN que haya sido sometido a mutagénesis aporta informaciones particulares sobre los aminoácidos que soportan su actividad. Así, si la modificación de un aminoácido implica la pérdida de la actividad biológica, es probable que este aminoácido interviene en la constitución del sitio activo que soporta esta actividad biológica. Estos resultados se deben, sin embargo, considerar con muchos matices: es por ejemplo posible que este aminoácido no intervenga directamente en el sitio activo de la actividad biológica, sino que tome parte en las actividades adjuntas, tal como el direccionamiento intracelular de la proteína por ejemplo. Por otra parte, es posible que la modificación introducida desestabilice el conjunto de la proteína, siendo el efecto de la sustitución introducida entonces indirecta y no directa. Por estas dos razones, es importante saber reconocer sobre un gen codificador para una proteína los restos que soportan las actividades de direccionamiento, de localización membranar, de enlace de cofactores ... Por otra parte, es esencial que las modificaciones introducidas inducen lo menos posible la desestabilización la proteína. A menudo, son pequeños aminoácidos hidrófobos, la Alanina o la Valina, que se introducen en sustitución de los aminoácidos de origen. Estos pequeños aminoácidos se conocen para conservar la mayoría de las estructuras secundarias proteicas (Hélice  $\alpha$  u hoja  $\beta$ ), y por lo tanto, para minimizar las desestabilizaciones globales de las proteínas.

Los trabajos realizados en este ámbito implican la creación de un gran número de mutantes puntuales que llevan, cada uno, una sustitución diferente de un aminoácido de la proteína por una alanina. Estos trabajos necesitan un volumen de trabajo muy importante, debiendo cada mutante ser realizado independientemente.

## ES 2 282 285 T3

Existen excepciones en los casos generales anteriormente presentados. La mutagénesis dirigida se utilizó en el contexto de la búsqueda de una ganancia de actividad. En el caso en que la región del sitio activo se conoce bien, se puede en efecto esperar que la modificación dirigida de los aminoácidos el constituyente es susceptible de implicar una mejora de la actividad. Así, se propone en la solicitud de patente europea nº 527809 sustituir secuencialmente los aminoácidos, de una región activa por un aminoácido frecuentemente implicado en los sitios activos (la serina por ejemplo) utilizando una técnica vinculada con la mutagénesis dirigida. Esta técnica presupone sin embargo disponer de informaciones precisas que se refieren al sitio activo de la molécula estudiada, y utiliza una tecnología que no permite introducir un gran número de modificaciones sobre un fragmento de ADN.

A la inversa, se realizaron algunas experiencias de mutagénesis aleatoria en un contexto de búsqueda de pérdida de actividad (Loeb *et al*, 1989, Nature, 340 : 397). En este caso, numerosos clones se deben analizar para obtener resultados concordantes y así liberarse de los límites establecidos por la sustitución aleatoria.

La presente invención es una técnica intermedia entre la mutagénesis dirigida y la mutagénesis aleatoria. En efecto, su objeto no es como en el caso de la mutagénesis dirigida simple de obtener un único producto al final de la reacción que contiene la o las mutaciones deseadas, sino de obtener una mezcla de moléculas que contienen, cada una, una o varias de las mutaciones deseadas. El objeto del procedimiento objeto de la presente invención no es tampoco introducir a nivel de una posición dada cualquier sustitución, tal como en el caso de la mutagénesis aleatoria, sino al contrario de introducir un tipo de sustitución particular y predefinido.

Este procedimiento combina así las ventajas de la mutagénesis dirigida (control de la naturaleza de las modificaciones obtenidas en una posición dada), y de la mutagénesis aleatoria (obtención de un gran número de mutaciones diferentes distribuidos sobre numerosas posiciones del fragmento de ADN que se debe mutar). Permite realizar en un tiempo muy corto un gran número de mutaciones dirigidas.

Estos objetivos se alcanzan según la invención gracias a un procedimiento de mutagénesis de un gen diana que consiste en preparar una serie de N oligonucleótidos de secuencia sustancialmente complementaria de al menos una región del gen diana, luego en hacer reaccionar dicha serie de oligonucleótido con dicho gen diana en condiciones que permiten la producción de copias del gen diana que lleva al menos una mutación. El gen diana es llevado por un plásmido circular de doble hebra. Cada oligonucleótido presente una secuencia complementaria de una diferente región del gen diana y al menos una mutación colocada en el centro de la secuencia del oligonucleótido. El conjunto N de dichos oligonucleótidos de la serie, con N superior a 5, cubre la totalidad o parte de la secuencia de dicho gen diana. Se hace a continuación reaccionar dicha serie de oligonucleótidos con el gen diana en presencia de una polimerasa de tal modo que genere un banco de genes mutados donde cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio en menos de 1/5 parte de los genes del banco.

El procedimiento de la invención es notable porque se disocia la dificultad unida a la posición de la mutación y la unida a su naturaleza; es por ejemplo posible realizar mutaciones de un tipo particular (por ejemplo cualquier codón hacia Alanina) sobre toda una secuencia codificadora. En este ejemplo, cada uno de los mutantes obtenidos al final de la reacción contiene una o varias mutaciones de naturaleza conocida (codón alanina), pero de posición no conocida. A la inversa, el procedimiento de la invención permite incorporar sobre algunas posiciones particulares oligonucleótidos que contienen bases degeneradas. En este ejemplo, las posiciones son relativamente conocidas (el número de posiciones es limitado), y la naturaleza de las mutaciones introducidas es desconocida.

Estas características contrastan con respecto a las técnicas de mutagénesis aleatoria, donde ni la naturaleza ni la posición de las mutaciones se conocen, y la mutagénesis dirigida clásica, donde la naturaleza y la posición de la mutación introducida son, conocidas.

El procedimiento de la invención es igualmente notable por el hecho de que al final de la reacción de mutagénesis, se dispone de un gran número de moléculas de ADN diferentes, constituyendo, por lo tanto, un banco. Estas moléculas corresponden a todas las moléculas de ADN que hayan incorporado al menos una mutación en los sitios previamente señalados. El número de moléculas mutantes diferentes es muy importante ya que todas las combinaciones de mutaciones son posibles.

El procedimiento de mutagénesis según la invención se puede igualmente aplicar a un banco de genes mutados. Se utiliza este banco entonces como matriz en lugar del gen diana. Se prepara una serie de N oligonucleótidos de secuencia sustancialmente complementaria de al menos una región de los genes mutados dianas, luego se hace reaccionar dicha serie de oligonucleótidos con dichos genes mutados dianas en condiciones que permiten la producción de copias de los genes mutados dianas que llevan al menos una mutación. Los genes mutados dianas se llevan por plásmidos circulares de doble hebra, y cada oligonucleótido presenta una secuencia complementaria de una diferente región de los genes mutados dianas y al menos una mutación colocada en el centro de la secuencia del oligonucleótido, el conjunto N de dichos oligonucleótidos de la serie, con N superior a 5, cubre la totalidad o parte de la secuencia de dichos genes mutados dianas. Se hace a continuación reaccionar dicha serie de oligonucleótidos con los genes mutados dianas en presencia de una polimerasa de tal modo que genere un banco de genes mutados donde cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio en menos de 1/5 de los genes del banco.

## ES 2 282 285 T3

Otra aplicación del procedimiento según la invención consiste en que el banco de genes mutados dianas utilizado como matriz fue previamente obtenido por el procedimiento de mutagénesis masiva. El número medio de mutaciones por molécula aumenta con el número de vueltas en mutagénesis masiva realizadas.

5 Según una forma ventajosa de realización del procedimiento de la invención, N está comprendido entre 5 y  $10^6$  y preferentemente entre 50 y 500, y cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio entre  $1/5$  y  $1/10^6$  y preferentemente entre  $1/50$  y  $1/500$  de los genes del banco.

10 El procedimiento de la invención prevé muy especialmente el caso donde la serie de oligonucleótidos comprende N oligonucleótidos diferentes y donde cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio aproximadamente  $1/N$  de los genes del banco, con N teniendo el valor citado más arriba.

15 Esta característica distingue el procedimiento de la invención del estado de la técnica anterior, donde los ejemplos de mutagénesis múltiple que utiliza simultáneamente varios oligonucleótidos se basan, al contrario, sobre tasas de incorporación de cada oligonucleótido superior a 75%. En efecto, estas aproximaciones tienen por objetivo aislar solamente el mutante que haya incorporado todos los oligonucleótidos, y las elevadas tasas de incorporación permiten fácilmente llegar a este objetivo. Al contrario, en el procedimiento según la invención, la frecuencia de mutación al nivel de cada una de las mutaciones que se deben introducir se controla de tal manera para no obtener moléculas de ADN que contienen un excesivo número de mutaciones. El objetivo consiste en disponer de mutantes que contienen cada una una mutación o una combinación de algunas mutaciones diferentes. Para ello, la relación entre la cantidad de cada oligonucleótido mutante y la cantidad de matriz que se debe mutar se debe controlar. Esta relación está comprendida entre 0,01 y 100, y preferentemente entre 0,1 y 10 según los casos.

20 La reacción entre la serie de oligonucleótidos con el gen diana o con el banco de genes mutados dianas se puede realizar con distintos tipos de polimerasa, ventajosamente termoestables. Un primer modo de realización consiste en utilizar una polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de hebra tal como la Taq polimerasa, o una actividad exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$  tal como la Pfu polimerasa. En este modo de realización, la reacción puede comprender la presencia de una ligasa. Un segundo modo de realización consiste en utilizar una polimerasa que no tiene actividad de desplazamiento de hebra o exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$  tal como la T4 polimerasa, y en este caso la reacción se realiza en ausencia de ligasa.

25 Los oligonucleótidos de la serie tienen un tamaño comprendido entre 10 y 100 y preferentemente entre 15 y 25 nucleótidos. Cada uno de ellos es homólogo de una parte de la secuencia de ADN que debe mutar, con exclusión de una o de algunas posiciones localizadas en su parte interna, que constituyen la o las mutaciones que se deben introducir. Estos oligonucleótidos pueden estar solapados, es decir, comprender secuencias comunes de dos regiones diferentes adyacentes. Los oligonucleótidos son preferentemente todos con la misma orientación, de tal modo que una única hebra del gen diana se replique, lo que permite obtener una tasa de mutagénesis baja.

30 En un modo de realización particular, los oligonucleótidos se reconstruyen a partir de dos oligonucleótidos, según el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. n° 5.858.731.

Ventajosamente, cada oligonucleótido comprende 1 o varias mutación(ones) y preferentemente de 1 a 3 mutación(ones) colocada(s) en el centro de su secuencia.

35 Dichas mutaciones de cada oligonucleótido se pueden elegir entre deleciones y/o inserciones de uno o varios nucleótido(s).

40 Una forma particular de mutaciones consiste en utilizar oligonucleótidos degenerados. Es decir cada oligonucleótido de la serie está presente en varios ejemplares, poseyendo cada ejemplar un nucleótido diferente a nivel de la o de dichas mutación(ones).

45 Otra forma particular de mutación consiste en que cada mutación es del tipo que permite introducir un codón idéntico en cada oligonucleótido o un codón que corresponde al mismo aminoácido, en sustitución del codón original del gen diana. Ventajosamente, dicho codón corresponde a un aminoácido elegido en el grupo que comprende Ala, Val, Gly, Leu, Ile.

El procedimiento de la invención se puede describir más precisamente con la ayuda de las siguientes etapas:

50 - Se prepara la matriz, preferentemente un plásmido que contiene el o los fragmentos de ADN que se deben mutar.

55 - Se sintetizan los oligonucleótidos mutantes diferentes preferentemente entre 5 y  $10^6$ , y más preferentemente entre 50 y 500, luego se mezcla el conjunto de los oligonucleótidos mutantes. La concentración final de cada uno de los oligonucleótidos en la mezcla es así dividida durante esta etapa por el número de oligonucleótidos.

- Se les añade a la matriz, es decir, al plásmido que contiene el o los fragmentos de ADN que deben mutar, a una concentración de tal modo que la relación entre el número de moléculas de matriz y el número de mo-

## ES 2 282 285 T3

léculas de cada uno de los oligonucleótidos mutantes este comprendida entre 0,01 y 100, y preferentemente entre 0,1 y 10.

- 5 - Se desnaturaliza la matriz por el calor (aproximadamente 95°C), de tal modo que disponga temporalmente de ADN de simple hebra. Durante la vuelta a una temperatura más baja, algunos o todos oligonucleótidos presentes en la mezcla se fijan en la matriz a nivel de su sitio de homología.
- 10 - Se añaden todos los elementos necesarios para a realizar una replicación de la matriz a partir de los oligonucleótidos mutantes, y, en particular, una polimerasa, permitiendo el tampón su actividad, de los nucleótidos trifosfatos en cantidad suficiente, los eventuales cofactores necesarios. La reacción de replicación tiene a continuación lugar en las condiciones de temperatura que corresponden a la actividad máxima de la polimerasa. Eventualmente, una ligasa se puede añadir en la etapa de replicación, de tal modo que las hebras de ADN neosintetizadas se ligen a nivel del extremo 5' de otro oligonucleótido, unido sobre la matriz en 3' del primero. En este caso, los oligonucleótidos son previamente fosforilados.
- 15 - Eventualmente, se repiten las etapas de desnaturalización y de replicación varias veces. En este caso, es preferible que la polimerasa sea termoestable, con el fin de evitar la necesidad de añadir enzima en cada ciclo. Al final de esta reacción, las moléculas de ADN presentes en la mezcla son de varios tipos:
- 20 - Por una parte, permanece la matriz inicial de doble hebra que no ha sido eficazmente replicada,
- Por otra parte, una parte de las moléculas fue replicada, es decir que contienen una hebra de origen y una hebra neosintetizada a partir de una o de varios cebadores que constituyen los oligonucleótidos mutantes.
- 25 - Se somete la mezcla obtenida a la digestión por la enzima DpnI, u otra enzima de restricción que permite suprimir las moléculas de ADN metiladas sobre las dos hebras y conservar las que no son metiladas o hemimetiladas.
- 30 - Se transforman bacterias competentes por la mezcla precedente, se extienden a continuación estas bacterias sobre un medio que contiene un agente selectivo de tal modo que se seleccionen las bacterias que integran un plásmido. Se eliminan las moléculas de ADN que hayan sido escindidas en la etapa anterior ya que la presencia de un plásmido circular completo es indispensable para la supervivencia de la bacteria en medio selectivo.
- 35 - Se toman muestras individualmente de las colonias bacterianas obtenidas y se utilizan para sembrar un medio nutritivo selectivo. Se realiza a continuación una preparación de ADN plásmido de estos cultivos con el fin de aislar una gran cantidad de ADN plásmido potencialmente mutante. Un examen de las distintas moléculas de ADN plásmidos en esta fase permite calcular la tasa media de incorporación de cada oligonucleótido, y verificar que ésta es cercana al valor buscado.
- 40 - Eventualmente, se ensaya la actividad biológica que corresponde a los distintos lotes de preparaciones plásmidas mutantes. La actividad medida puede ser superior a la del fragmento no mutado, igual, o inferior. En el caso en que la actividad es modificada, el plásmido correspondiente es secuenciado de tal modo que pueda localizar la posición de la mutación introducida. En un modo de realización preferido, se ensaya la actividad biológica que corresponde a las moléculas mutantes, y se compara esta medida con la de la actividad biológica que corresponde a la molécula de ADN plásmido no mutada. Cuando la observación de estas medidas evidencia una diferencia significativa, las moléculas mutantes están secuenciadas con el fin de poner de relieve la posición de la mutación en el origen de esta modificación de actividad. El orden de estas dos últimas etapas se invierte con respecto a las técnicas habituales de mutagénesis dirigida, que implican generalmente la obtención y la comprobación de la molécula mutante previo al ensayo de su actividad biológica.

Así, una forma de realización del procedimiento de mutagénesis según la invención comprende las siguientes etapas:

- 55 a) se prepara una matriz constituida de un plásmido que contiene el gen diana o el banco de genes mutados dianas y un gen de resistencia,
- 60 b) se prepara una serie equimolecular de oligonucleótidos que presentan una secuencia complementaria de una región diferente del gen diana o el banco de genes mutados dianas y al menos una mutación colocada en el centro de la secuencia del oligonucleótido, cubriendo el conjunto de los oligonucleótidos de la serie la totalidad o parte de la secuencia de dicho gen diana,
- 65 c) se mezcla la serie de oligonucleótidos preparada en la etapa (b) con el plásmido de la etapa (a) según una relación molar de cada oligonucleótido con respecto al plásmido comprendida entre 0,01 y 100 y preferentemente entre 0,1 y 10,

## ES 2 282 285 T3

- d) se desnaturaliza la mezcla de la etapa (c) por la temperatura de tal modo que se obtenga una matriz de simple hebra,
- e) se somete la mezcla de la etapa (d) a una temperatura que permite la hibridación de los oligonucleótidos sobre la matriz,
- f) se añade a la mezcla al menos una polimerasa, su tampón y sus cofactores, y una cantidad suficiente de cada uno de los nucleótidos trifosfatos, para permitir la replicación de las hebras de la matriz a partir de una cualquiera de los oligonucleótidos,
- g) eventualmente se repiten las etapas (d), (e) y (f),
- h) se seleccionan mediante cualquier medio apropiado los productos de la etapa (f) o (g) que hayan sido sometidos a la replicación,
- i) se transforman los productos seleccionados en la etapa (h) en bacterias competentes, y se seleccionan los productos que llevan un plásmido sobre un medio selectivo que corresponde a un gen de resistencia llevado por el plásmido de la etapa (a).

Ventajosamente, la etapa (h) anteriormente mencionada consiste en someter los productos de la etapa (f) a la acción de una enzima de restricción que selecciona los productos que hayan sido sometidos a la replicación, tal como la enzima DpnI.

Los oligonucleótidos se pueden fosforilar en su extremo 5' cuando en la etapa (f) se añade una ligasa, ventajosamente una ligasa termoestable.

El procedimiento de mutagénesis según la invención es especialmente útil para medir la actividad biológica de las proteínas mutadas codificadas por los genes dianas mutados. En consecuencia, el gen diana es una molécula de ácido nucleico codificador de una proteína de interés con o sin sus propias secuencias de regulación. Si el gen diana no comprende las secuencias de regulación, tal como un promotor, éstas están presentes a nivel del plásmido.

Por lo tanto, la invención se refiere también a un procedimiento de mutagénesis de una proteína diana o de un banco de proteínas mutadas dianas, caracterizado porque comprende la preparación de un banco de expresión de genes mutados a partir de un gen diana codificador para dicha proteína según el procedimiento de mutagénesis descrito anteriormente, luego la expresión de dichos genes mutados para producir un banco de proteínas mutadas, y eventualmente el cribado de dichas proteínas mutadas para una función deseada, ventajosamente con respecto a la proteína diana.

Por lo tanto, la invención permite la realización de un procedimiento de selección de proteínas mutadas que presentan una actividad modificada con respecto a la misma proteína no mutada, o del gen mutado que corresponde a dicha proteína mutada, que comprende un procedimiento de mutagénesis citado más arriba, luego después del cribado de dichas proteínas mutadas para una función deseada, ventajosamente con respecto a la proteína diana, presentando la selección de la proteína mutada la función deseada, y eventualmente el secuenciado del gen mutado que corresponde a dicha proteína mutada.

Estos procedimientos de mutagénesis de una proteína diana o de un banco de proteínas mutadas dianas o de selección de una proteína mutada o del gen que corresponde según la invención se caracterizan porque comprenden la preparación de un banco de expresión de genes mutados a partir de un gen diana codificador de dicha proteína, luego las siguientes etapas:

- j) se incuba el medio selectivo a la temperatura adecuada durante el tiempo suficiente al crecimiento de colonias bacterianas individuales,
- k) se siembran cultivos de bacterias individuales a partir de las colonias de la etapa (j),
- l) se efectúan preparaciones de ADN plásmido de los cultivos de la etapa (k),
- m) se mide la actividad biológica asociada a cada preparación de ADN plásmido de la etapa (l) y se compara el resultado obtenido con respecto al medido utilizando el ADN plásmido no mutado.
- n) eventualmente, se secuencian las preparaciones de ADN plásmido que hayan permitido observar modificaciones significativas de la actividad biológica.

## ES 2 282 285 T3

La invención tiene igualmente por objeto una serie de oligonucleótidos mutados con respecto a un gen diana o al banco de genes mutados dianas tal como se define anteriormente.

5 La invención tiene también por objeto un banco de genes mutados susceptibles de ser obtenido por un procedimiento descrito anteriormente caracterizado porque cada mutación diferente está presente en término medio en menos de 1/5 parte de los genes del banco y preferentemente en término medio en aproximadamente 1/N partes de los genes del banco, con N superior a 5, preferentemente con N comprendido entre 5 y 10<sup>6</sup> y muy preferentemente con N comprendido entre 50 y 500. Preferentemente, este banco se obtiene, de acuerdo con el procedimiento de la invención, gracias al empleo de N oligonucleótidos con N superior a 5, preferentemente con N comprendido entre 5 y 10<sup>6</sup> y muy preferentemente con N comprendido entre 50 y 500.

Otras ventajas y características de la invención aparecerán en los ejemplos que siguen y dibujos adjuntos en los cuales:

15 La figura 1 representa una repartición de los oligonucleótidos mutantes sobre la secuencia de la molécula CD4. Cada uno de los oligonucleótidos contiene tres mutaciones como máximo, representadas aquí por el fragmento de la línea de la flecha, localizadas en su centro, destinadas a cambiar el codón pretendido en Alanina. Los oligonucleótidos se solapan los unos con los otros, y están representados aquí sobre tres niveles como medida de claridad. En el ejemplo de la figura 1, solamente 24 oligonucleótidos mutantes están representados. En el ejemplo 1 siguiente, 95 oligonucleótidos se han utilizado simultáneamente. En este ejemplo, los oligonucleótidos que llevan las mutaciones son todos de la misma orientación.

25 La figura 2 es un resumen esquemático de las etapas del procedimiento de mutagénesis según la invención a partir de los oligonucleótidos mutantes de la figura 1. Las mutaciones en las moléculas de ADN están representadas por una barra vertical. Las letras significan:

- (a) polimerización (polimerasa, dNTP, Tampón y cofactores);
- (b) digestión por DpnI para eliminar las matrices iniciales;
- 30 - (c) transformación de bacterias competentes después de la extensión sobre medio selectivo;
- (d) siembra de cultivos bacterianos a partir de las colonias aisladas después de la preparación de ADN plásmido.
- 35 - (e) ensayo fenotípico después de la selección y secuenciado de los mutantes que tienen el fenotipo buscado.

40 La figura 3 representa un ejemplo de construcción de oligonucleótidos mutantes a partir de semi-oligonucleótidos que comprende una ligación por la T4 ligasa.

La figura 4 da ejemplos de representación esquemática de los oligonucleótidos que contienen bases degeneradas a nivel de los puntos de mutación. La letra N significa que una cualquiera de las 4 bases puede estar presente en este lugar. Así, el oligonucleótido en cuestión está realmente constituido por una mezcla de 4<sup>N</sup> especies moleculares.

### 45 Ejemplo 1

#### *Alanine-scanning*

50 Se introdujo un gen codificador de la molécula CD4 en el vector SK+. Los 95 primeros codones de este gen fueron la diana de una reacción de mutagénesis masiva según la técnica de la invención.

Para ello, se sintetizó una serie de 95 oligonucleótidos de 21 bases. Cada uno de estos oligonucleótidos era complementario de una secuencia del gen CD4 centrada sobre un codón. Así, el primer oligonucleótido era homólogo de una secuencia centrada en el codón 1. Era perfectamente homólogo a 9 bases de cada lado de dicho codón, y contenía 3 mutaciones, destinadas a transformar el primer codón en codón Alanina (Figura 1).

Del mismo modo, el segundo oligonucleótido fue centrado en el segundo codón y contenía tres mutaciones adyacentes en su medio.

60 Los 95 oligonucleótidos, solapados entre sí y todos con la misma orientación, se mezclaron a continuación de manera equimolar y fosforilados utilizando la quinasa de T4 en condiciones normales de utilización.

65

## ES 2 282 285 T3

La reacción siguiente se realizó a continuación:

	Matriz SK-CD4 (250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ):	1 $\mu\text{l}$
5	MIX de los 95 oligonucleótidos 5' P (0,5 $\mu\text{M}$ cada uno)	2 $\mu\text{l}$
	dNTP Trifosfatos (2,5 mM)	10 $\mu\text{l}$
	Tampón 10X de Pfu Polimerasa	2,5 $\mu\text{l}$
	ATP 10 mM	0,5 $\mu\text{l}$
10	Pfu Polimerasa (2,5 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
	Pfu Ligasa (4 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O	7 $\mu\text{l}$
	Total	<u>25 <math>\mu\text{l}</math></u>

15 Se someta la mezcla a una reacción de 12 ciclos de temperaturas [(94°C, 1'); (35°C, 1'); (68°C, 20')].

La mezcla de la reacción ha sido sometida a continuación a una digestión por 5 unidades de la enzima DpnI en condiciones de tampón adaptadas, durante 30' a 37°C.

20 Algunas bacterias competentes fueron transformadas por esta mezcla utilizando un protocolo de choque térmico, y fueron extendidas sobre una placa de Petri que contiene el agente selectivo.

El día siguiente, se obtuvo miles de bacterias.

25 En la figura 2 se presenta un esquema que resume las etapas de la técnica.

En esta fase, se realizó un ensayo estadístico de algunas moléculas de ADN del banco para medir la tasa de integración de las mutaciones, es decir, la sustitución de uno de los 95 codones por un codón Alanina. Este examen revelaba que la frecuencia de incorporación de cada oligonucleótido fue próximo a 1%, lo que ha sido en este caso el valor buscado (1/N con N = 95).

30 Las moléculas mutantes fueron ampliadas a continuación por cultivo bacteriano y preparación de ADN plásmido. Cada uno de los lotes de ADN plásmido, que corresponde a un único tipo de molécula mutante, se utilizó para transfectar las células eucariotas, y éstas fueron ensayadas para el mantenimiento o la pérdida de los epítomos llevados por la molécula CD4, siendo esta actividad medida por el enlace de un anticuerpo anti-CD4.

### Ejemplo 2

40 *Valine-scanning utilizando la reconstrucción de los oligonucleótidos reconstruidos a partir de semi-oligonucleótidos*

Se reconstruyó una serie de 11 oligonucleótidos a partir de dos semi-oligonucleótidos de doble hebra. La ligación de los dos semi-oligonucleótidos fue efectuada por una reacción que utilizaba la T4 ligasa. Estando solo uno de los dos semi-oligonucleótidos fosforilado a nivel de uno de sus extremos 5', esta reacción tuvo como efecto permitir la obtención de un único oligonucleótido completo, compuesto de 18 bases (8 de cada lado perfectamente homólogos, y dos en su medio invariablemente constituidas a los nucleótidos GT (figura 3).

50 Estas mutaciones, destinadas a sustituir a los dos primeros nucleótidos de cualquier codón, permiten sustituir a este codón por un codón Valina. En efecto, estando el código genético degenerado, los codones valina se pueden escribir bajo la forma GTN, donde N representa una cualquiera de las cuatro bases.

Una vez obtenidos estos 11 oligonucleótidos reconstruidos, homólogos a 11 regiones distintas de la molécula CD4, pero llevando la misma mutación (cambio en Valina), por otra parte, orientados en el mismo sentido, el protocolo era idéntico al expuesto en el ejemplo 1.

55 Se buscó una frecuencia media de incorporación de los oligonucleótidos mutantes de aproximadamente 9% (1/11) en este ejemplo.

### Ejemplo 3

60 *Mejora de un sitio activo por mutagénesis masiva de saturación*

Una vez conocidos los aminoácidos que forman parte directamente en el sitio activo de una proteína, por ejemplo gracias a datos de mutagénesis masiva tal como se presenta en los ejemplos anteriores, estos aminoácidos se pueden someter a una mutagénesis masiva de saturación, es decir, que pretende introducir un gran número de codones diferentes en sustitución de un codón particular. Así, 6 codones del gen codificador para la proteína agaB, enzima implicada en la síntesis de los azúcares, se identificó como que forma parte directamente de la actividad de la enzima.

## ES 2 282 285 T3

Se sintetizaron seis oligonucleótidos centrados en estos codones. Por cada lado, eran completamente homólogos de 9 bases de la secuencia. A nivel de los dos primeros nucleótidos de los codones que se deben mutar, la secuencia salvaje fue sustituida por la secuencia NN (figura 4). De esta forma, cada uno de los 6 codones podía ser sustituido por distintos codones específicos de otros aminoácidos.

5 Una vez obtenidos estos oligonucleótidos, la reacción de mutagénesis masiva era idéntica a la descrita en el ejemplo 1.

10 Se buscaba una frecuencia media de incorporación de los oligonucleótidos mutantes de aproximadamente 17% (1/6) en este ejemplo.

Estas moléculas de ADN plásmido estaban destinadas a ser cribadas de tal modo que midieran un aumento de la actividad de la enzima.

15 Este ejemplo, aunque no utiliza más que un número reducido de oligonucleótidos mutantes que contienen bases degeneradas, demuestra la viabilidad de la adaptación de la técnica de la invención en la mutagénesis de naturaleza aleatoria (cambio de un codón en un gran número de otros codones) pero de posiciones determinadas.

### Ejemplo 4

#### 20 *Optimización de los codones de un gen*

Los genes contienen generalmente codones que son desfavorables a la expresión de las proteínas para las cuales están codificados. Estos codones desfavorables se pueden ver como un mecanismo de regulación de la expresión de un gen. Estos codones desfavorables se identifican relativamente bien, y puede ser necesario modificarlos en un codón más favorable a la expresión de la proteína pero que no induce cambio de aminoácido.

30 Por regla general, aproximadamente el 5% de los codones de un gen son desfavorables, y limitan el nivel de expresión de la proteína correspondiente. La modificación de estos codones puede permitir la obtención de mejores niveles de expresión del gen durante la producción "*in vitro*" de la proteína correspondiente.

No obstante, la modificación simultánea de todos los codones no permite obtener esta mejora del nivel de expresión, probablemente a causa de la desestabilización general de la secuencia por un excesivo número de modificaciones.

35 Los mejores niveles de expresión se obtienen a menudo cuando se modifican una parte solamente de los codones desfavorables.

40 En este caso, se puede realizar un banco de mutaciones que llevan sobre estos codones desfavorables utilizando la técnica de la invención, y se seleccionan entonces las moléculas mutantes que presentan las mejores tasas de expresión. Para ello, se debe sintetizar un oligonucleótido mutante para cada codón desfavorable, estando las mutaciones llevadas por estos oligonucleótidos definidas por el hecho de que cambian un codón desfavorable a la expresión en codón que le es favorable, sin cambiar la secuencia primaria de la proteína correspondiente.

45 En este contexto, la frecuencia media de incorporación de los oligonucleótidos mutantes se puede buscar en una horquilla relativamente amplia, por ejemplo entre 1 y 20%. En efecto, no se conoce el número de mutaciones simultáneas que permite la obtención del mejor nivel de expresión. En este contexto, varios bancos que corresponde a frecuencias de incorporación diferentes pueden ser realizados. Para realizar estos bancos que tienen tasas de mutaciones diferentes, es posible bien sea realizar el procedimiento descrito utilizando concentraciones variables de oligonucleótidos, o bien realizar varias veces seguidas el procedimiento de mutagénesis masiva, es decir, utilizar el banco de mutantes producido durante una primera etapa de mutagénesis masiva como matriz de una segunda etapa de mutagénesis masiva.

50 El procedimiento es similar al presentado en el ejemplo 1. Las moléculas mutantes se criban a continuación según el criterio de su nivel de expresión: se seleccionan las moléculas que presentan los mejores niveles de expresión.

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de mutagénesis de un gen diana, que consiste en preparar una serie de N oligonucleótidos, presentando cada oligonucleótido una secuencia complementaria de una región diferente del gen diana y de una a tres mutaciones colocadas en el centro de la secuencia del oligonucleótido, luego en hacer reaccionar dicha serie de oligonucleótidos con dicho gen diana en condiciones que permiten la producción de copias del gen diana que lleva al menos una mutación, **caracterizado** porque el gen diana es llevado por un plásmido circular de doble hebra, el conjunto N de dichos oligonucleótidos de la serie, con N superior a 5, cubriendo la totalidad o parte de la secuencia de dicho gen diana, y porque se hace reaccionar dicha serie de oligonucleótidos con el gen diana en presencia de una polimerasa de tal modo que genere después de la selección por una enzima de restricción que permite suprimir las moléculas de ADN metiladas sobre las dos hebras y conservar las que no están metiladas o hemi-metiladas, un banco de genes mutados donde cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio en menos de 1/5 de los genes del banco.
2. Procedimiento de mutagénesis de un banco de genes mutados dianas, que consiste en preparar una serie de N oligonucleótidos, presentando cada oligonucleótido una secuencia complementaria de una región diferente de los genes mutados dianas y de una a tres mutaciones colocadas en el centro de la secuencia del oligonucleótido, luego en hacer reaccionar dicha serie de oligonucleótidos con dichos genes mutados dianas en condiciones que permiten la producción de copias de los genes dianas que llevan al menos una mutación, **caracterizado** porque los genes mutados dianas se llevan por plásmidos circulares de doble hebra, el conjunto N de dichos oligonucleótidos de la serie, con N superior a 5, cubriendo la totalidad o parte de la secuencia de dichos genes mutados dianas, y porque se hace reaccionar dicha serie de oligonucleótidos con los genes mutados dianas en presencia de una polimerasa de tal modo que genere después de la selección por una enzima de restricción que permite suprimir las moléculas de ADN metiladas sobre las dos hebras y conservar las que no están metiladas o hemi-metiladas, un banco de genes mutados donde cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio en menos de 1/5 de los genes del banco.
3. Procedimiento de mutagénesis según la reivindicación 2, en el cual el banco de genes mutados dianas se obtuvo según el procedimiento de la reivindicación 1.
4. Procedimiento de mutagénesis según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque N está comprendido entre 5 y  $10^6$ , y porque cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio en entre 1/5 y  $1/10^6$ .
5. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la serie de oligonucleótidos comprende N oligonucleótidos diferentes y porque cada mutación procedente de un oligonucleótido diferente está presente en término medio en aproximadamente  $1/N$  de los genes del banco.
6. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque se hace reaccionar la serie de oligonucleótidos con el gen diana o el banco de genes mutados dianas según una relación molar de cada oligonucleótido con respecto al gen diana o al banco de genes mutados dianas comprendido entre 0,01 y 100.
7. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque se hace reaccionar la serie de oligonucleótidos con el gen diana o el banco de genes mutados dianas en presencia de una polimerasa que tienen una actividad de desplazamiento de hebra tal como la Taq polimerasa o una actividad exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$  tal como el Pfu polimerasa.
8. Procedimiento de mutagénesis según la reivindicación 7, **caracterizado** porque se hace reaccionar la serie de oligonucleótidos con el gen diana o el banco de genes mutados dianas en presencia de una polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de hebra o una actividad exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$  y una ligasa.
9. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque se hace reaccionar la serie de oligonucleótidos con el gen diana o el banco de genes mutados dianas en presencia de una polimerasa que no tiene actividad de desplazamiento de hebra o actividad exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$ , tal como la T4 polimerasa, y en ausencia de ligasa.
10. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los oligonucleótidos de la serie se solapan o no y presentan un tamaño comprendido entre 10 y 100.
11. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque cada oligonucleótido comprende de 1 a 3 mutación(ones) colocada(s) en el centro de su secuencia.
12. Procedimiento según una cualquier de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque las mutaciones de cada oligonucleótido se eligen entre delecciones y/o inserciones de uno o varios nucleótido(s).
13. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque cada oligonucleótido de la serie está presente en varios ejemplares, poseyendo cada ejemplar un nucleótido diferente a nivel de la o de dichas mutación(ones).

## ES 2 282 285 T3

14. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque cada mutación es del tipo que permite introducir un codón idéntico en cada oligonucleótido o un codón que corresponde al mismo aminoácido, en sustitución del codón original del gen diana.
- 5 15. Procedimiento de mutagénesis según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicho codón corresponde a un aminoácido elegido de entre el grupo que comprende Ala, Val, Gly, Leu, Ile.
16. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- 10
- a) se prepara una matriz constituida de un plásmido que contiene el gen diana o el banco de genes mutados dianas y un gen de resistencia,
  - b) se prepara una serie equimolecular de oligonucleótidos que presentan una secuencia complementaria de una región diferente del gen diana o del banco de genes mutados dianas y al menos una mutación colocada en el centro de la secuencia del oligonucleótido, cubriendo el conjunto de los oligonucleótidos de la serie la totalidad o parte de la secuencia de dicho gen diana o de dicho banco de genes mutados dianas,
  - 15 c) se mezcla la serie de oligonucleótidos preparada en la etapa (b) con el plásmido de la etapa (a) según una relación molar de cada oligonucleótido con respecto al plásmido comprendida entre 0,01 y 100,
  - 20 d) se desnaturaliza la mezcla de la etapa (c) por la temperatura de tal modo que se obtenga una matriz de simple hebra,
  - 25 e) se somete la mezcla de la etapa (d) a una temperatura que permite la hibridación de los oligonucleótidos sobre la matriz,
  - f) se añade a la mezcla una polimerasa, su tampón y sus cofactores, y una cantidad suficiente de cada uno de los nucleótidos trifosfatos, para permitir la replicación de las hebras de la matriz a partir de uno cualquier de los oligonucleótidos,
  - 30 g) eventualmente se repiten las etapas (d), (e) y (f),
  - h) se seleccionan mediante cualquier medio apropiado los productos de la etapa (f) o (g) que hayan sido sometidos a la replicación,
  - 35 i) se transforman los productos seleccionados en la etapa (h) en bacterias competentes, y se seleccionan los productos que llevan un gen mutado sobre un medio selectivo que corresponde a un gen de resistencia llevado por el plásmido de la etapa (a).
- 40 17. Procedimiento de mutagénesis según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la etapa (h) consiste en someter los productos de la etapa (f) a la acción de una enzima de restricción que selecciona los productos que hayan sido sometidos a la replicación.
- 45 18. Procedimiento de mutagénesis según la reivindicación 17, **caracterizado** porque la enzima de restricción que selecciona los productos que hayan sido sometidos a la replicación es la enzima DpnI.
19. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado** porque los oligonucleótidos están fosforilados en su extremo 5' y porque a la etapa (f) se añade una ligasa.
- 50 20. Procedimiento de mutagénesis según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el gen diana es una molécula de ácido nucléico codificador para una proteína de interés con o sin sus propias secuencias de regulación.
- 55 21. Procedimiento de mutagénesis de una proteína diana o de un banco de proteínas mutadas dianas, **caracterizado** porque comprende la preparación de un banco de expresión de genes mutados a partir de un gen diana codificador para dicha proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, luego porque se expresan dichos genes mutados para producir un banco de proteínas mutadas, y eventualmente porque se criban dichas proteínas mutadas para una función deseada.
- 60 22. Procedimiento de selección de proteínas mutadas que presentan una actividad modificada con respecto a la misma proteína no mutada, o del gen mutado que corresponde a dicha proteína mutada, **caracterizado** porque comprende un procedimiento de mutagénesis según la reivindicación 21, porque después del cribado de dichas proteínas mutadas para una función deseada, se selecciona la proteína mutada que presenta la función deseada, y eventualmente se secuencia el gen mutado que corresponde a dicha proteína mutada.
- 65 23. Procedimiento de mutagénesis de una proteína diana o de un banco de proteínas mutadas dianas según la reivindicación 21 o de selección de una proteína mutada o del gen correspondiente según la reivindicación 22, **caracterizado**

## ES 2 282 285 T3

porque comprende la preparación de un banco de expresión de genes mutados a partir de un gen diana codificador para dicha proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, **caracterizado** porque comprende después de la etapa (i), las siguientes etapas:

- 5           j) se incuba el medio selectivo a la temperatura adecuada durante el tiempo suficiente al crecimiento de colonias bacterianas individuales,
- k) se siembran cultivos de bacterias individuales a partir de las colonias de la etapa (j),
- 10          l) se efectúan preparaciones de ADN plásmido de los cultivos de la etapa (k),
- m) se mide la actividad biológica asociada a cada preparación de ADN plásmido de la etapa (l) y se compara el resultado obtenido con respecto al medido utilizando el ADN plásmido no mutado,
- 15          n) eventualmente, se secuencian las preparaciones de ADN plásmido que hayan permitido observar modificaciones significativas de la actividad biológica.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

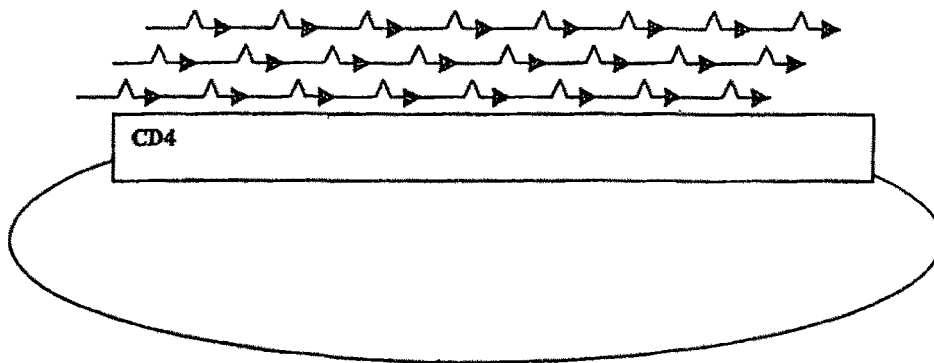
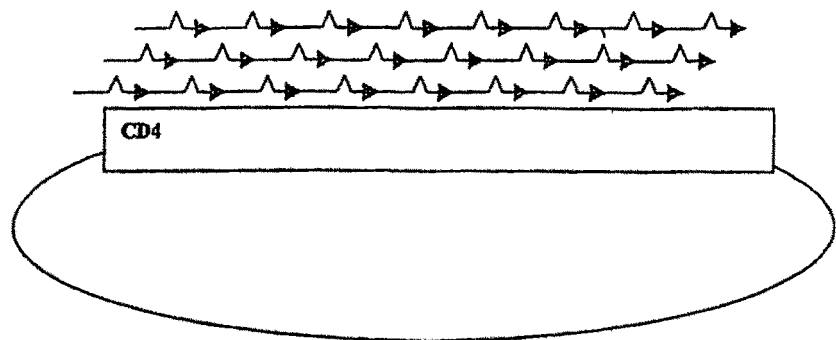
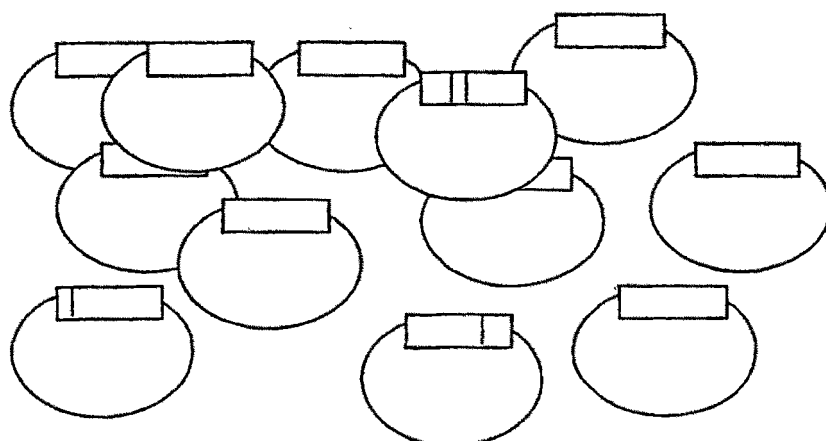


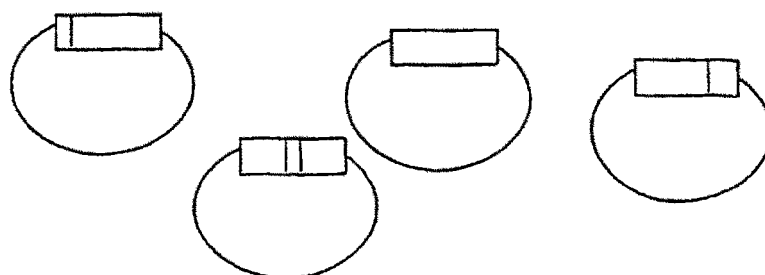
FIG. 2



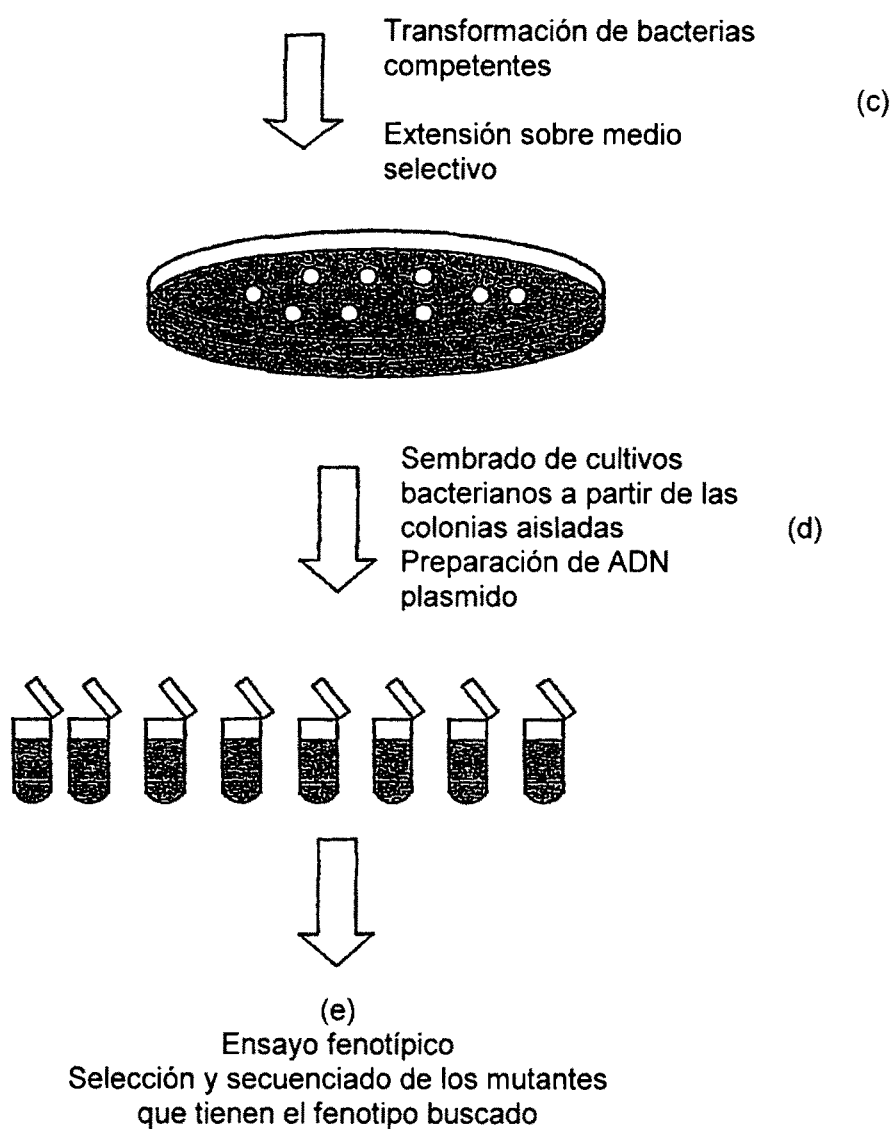
Polimerasa  
DNTP  
Tampón y cofactores (a)



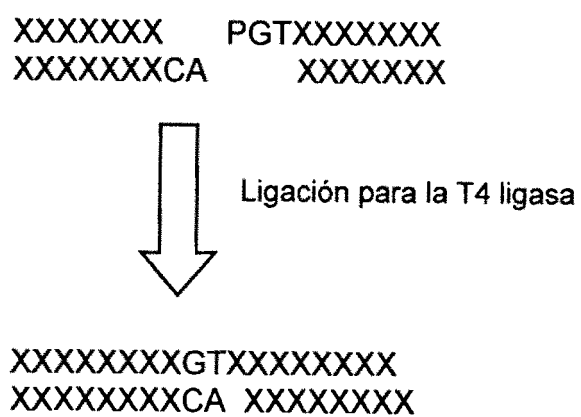
Digestión por DpnI para  
eliminar las matrices  
iniciales (b)



**FIG. 2** (continuación)



**FIG. 3**



**FIG. 4**

CCGTGTGATNACGTGCAGA	4 especies moleculares
ATCGATAGGNNAGAGTCTTA	16 especies moleculares
ATGGGATGANNNAGTTCGATG	64 especies moleculares