

(11) Número de Publicação: **PT 1436404 E**

(51) Classificação Internacional:

**C12P 19/34** (2007.10) **C12P 21/06** (2007.10)  
**C07H 21/04** (2007.10) **C12Q 1/68** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2002.09.19**

(30) Prioridade(s): **2001.09.19 US 323455 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.07.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.11.11**  
**242/2009**

(73) Titular(es):

**ALEXION PHARMACEUTICALS INC.**  
**352 KNOTTER DRIVE CHESHIRE, CT 06410 US**

(72) Inventor(es):

<b>KATHERINE S. BOWDISH</b>	US
<b>SHANA FREDERICKSON</b>	US
<b>TOSHIAKI MARUYAMA</b>	US
<b>YING-CHI LIN</b>	US
<b>MARK RENSHAW</b>	US

(74) Mandatário:

**ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO**  
**RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA** PT

(54) Epígrafe: **MOLDES MANIPULADOS E SUA UTILIZAÇÃO EM AMPLIFICAÇÃO COM INICIADOR ÚNICO**

(57) Resumo:

## **DESCRIÇÃO**

### **"MOLDES MANIPULADOS E SUA UTILIZAÇÃO EM AMPLIFICAÇÃO COM INICIADOR ÚNICO"**

#### **Campo técnico**

Esta divulgação refere-se moldes manipulados úteis para amplificação de uma sequência de ácido nucleico alvo. Mais especificamente, moldes que são manipulados para conter sequências complementares nas suas extremidades opostas são proporcionados por uma reacção de extensão de oligonucleótido interna (NOER). O molde manipulado permite Amplificação com Inciador Único (SPA) para amplificar uma sequência alvo no molde manipulado. Em formas de realização particularmente úteis, as sequências alvo dos moldes manipulados são clonadas em veículos de expressão para proporcionar uma biblioteca de polipéptidos ou proteínas, tal como, por exemplo, uma biblioteca de anticorpos.

#### **Antecedentes da Técnica Relacionada**

Os métodos para amplificação de ácidos nucleicos e detecção de produtos de amplificação auxiliam na detecção, identificação, quantificação e análise de sequência de sequências de ácidos nucleicos. A amplificação de ácidos nucleicos é um passo importante na construção de bibliotecas de genes relacionados, tal como, por exemplo anticorpos. Estas bibliotecas podem ser pesquisadas para anticorpos possuindo actividades específicas,

desejáveis. A análise de ácido nucleico é importante para a detecção e identificação de patogénicos, detecção da alteração de genes que leva a fenótipos definidos, diagnóstico de doenças génica ou a susceptibilidade a uma doença, avaliação da expressão de um gene no desenvolvimento, doença e em resposta a estímulos definidos, assim como os vários projectos de genoma. Outras aplicações do método da amplificação de ácidos nucleicos incluem a detecção de células raras, detecção de patogénicos e a detecção da expressão de genes alterada em malignidade, e semelhantes. A amplificação de ácidos nucleicos é também útil para análise qualitativa (tal como, por exemplo, a detecção da presença de sequências definidas de ácido nucleico) e a quantificação de sequências de genes definidas (úteis, por exemplo, na avaliação da quantidade de sequências patogénicas, assim como a determinação de multiplicação ou deleção do gene e transformação de células do tipo de célula normal para maligna, etc.). A detecção das alterações de sequência numa sequência de ácido nucleico é importante para a detecção de genótipos mutantes, como relevantes para análise genética, detecção de mutações que levam a resistência a fármaco, farmacogenómica, etc.

Existem muitas variações de amplificação de ácido nucleico, por exemplo, amplificação exponencial, amplificação linear ligada, amplificação com base em ligação e amplificação com base em transcrição. Um exemplo de método de amplificação exponencial de ácidos nucleicos é a reacção de polimerização em cadeia (PCR) que foi divulgada em várias publicações. Ver, por exemplo, Mullis *et al.* *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273 (1986); Mullis K. EP 201184; Mullis *et al.* Pat. U.S. N° 4582788; Erlich *et al.*, documentos EP 50424, EP 84796, EP 258017, EP 237362; e Saiki R. *et al.* Pat. U. S. N° 4683194. De facto, a

reacção em cadeia pela polimerase (PCR) é o método de amplificação de alvo mais regularmente utilizado. A PCR baseia-se em ciclos múltiplos de desnaturação, hibridação de dois iniciadores de oligonucleótido diferentes, cada uma para a cadeia oposta das cadeias alvo e extensão do iniciador através de uma polimerase de nucleótido para produzir múltiplas cópias de cadeia dupla da sequência alvo.

Também foram divulgados métodos de amplificação que empregam um único iniciador. Ver, por exemplo, Pat. U.S. Nº 5508178; 5595891; 5683879; 5130238; e 5679512. O iniciador pode ser um iniciador químérico de ADN/ARN, como divulgado na Pat. U.S. Nº 5744308.

Alguns métodos de amplificação utilizam oligonucleótidos de troca de molde (TSO) e oligonucleótidos bloqueadores. Por exemplo, uma amplificação de troca de molde na qual são utilizados iniciadores de ADN químéricos é divulgado nas Pat. U.S. Nº 5679512; 5962272; 6251639 e por Patel *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 2969-2974 (1996).

Todavia, os métodos de amplificação de alvo previamente descritos possuem várias desvantagens. Por exemplo, os métodos de amplificação à base de transcrição, tais como Amplificação Baseada na Sequência de Ácidos Nucleicos (NASBA) e amplificação mediada por transcrição (TMA), são limitados pela necessidade de incorporação da sequência do promotor da polimerase no produto de amplificação por um iniciador, um processo com fortes probabilidades de resultar em amplificações não específicas. Outro exemplo de uma desvantagem dos métodos correntes de amplificação é a necessidade de dois eventos de ligação que podem possuir ligação óptima a diferentes temperaturas, assim

como a utilização de iniciadores contendo sequências que ocorrem naturalmente. Esta combinação de factores resulta no aumento da probabilidade de desemparelhamento e resultante amplificação de sequências diferentes da sequência alvo.

Por isso, existe uma necessidade para métodos melhorados de amplificação de ácidos nucleicos que superem estas desvantagens. A invenção aqui proporcionada satisfaz esta necessidade e proporciona benefícios adicionais.

## Sumário

Foram agora descobertos novos métodos de amplificação de ácidos nucleicos que incluem os passos de: a) emparelhamento de um iniciador com uma sequência de ácido nucleico molde, possuindo o iniciador uma primeira porção que emparelha com o molde e uma segunda porção da sequência pré-determinada que não emparelha com o molde; b) síntese de um polinucleótido que é complementar, à porção do molde entre a localização na qual a primeira porção do iniciador emparelha com o molde e a extremidade do molde, possuindo o polinucleótido uma primeira extremidade e uma segunda extremidade, em que a primeira extremidade incorpora o iniciador; c) separação o polinucleótido sintetizado no passo (b) do molde; d) emparelhamento um oligonucleótido molde com a segunda extremidade do polinucleótido sintetizado no passo (b), possuindo o oligonucleótido molde uma primeira porção que emparelha com a segunda extremidade do polinucleótido e uma segunda porção possuindo a mesma sequência pré-determinada como a segunda porção do iniciador; e) extensão do o polinucleótido sintetizado no passo (b) para proporcionar uma sua porção terminal que é

complementar à sequência pré-determinada, em que o referido oligonucleótido molde não é estendido na sua extremidade 3'; e f) amplificação do polinucleótido estendido utilizando um único iniciador possuindo a sequência pré-determinada.

Numa forma de realização alternativa, o método inclui os passos de a) emparelhamento de um iniciador e um oligonucleótido de fronteira com uma sequência de ácido nucleico molde, possuindo o iniciador uma primeira porção que emparelha com o molde e uma segunda porção da sequência pré-determinada que não emparelha com o molde; b) síntese de um polinucleótido que é complementar à porção do molde entre a localização na qual a primeira porção do iniciador emparelha com o molde e a porção do molde com a qual o oligonucleótido de fronteira emparelha, possuindo o polinucleótido uma primeira extremidade e uma segunda extremidade, em que a primeira extremidade incorpora o iniciador; c) separação do polinucleótido sintetizado no passo (b) do molde; d) emparelhamento de um oligonucleótido molde com a segunda extremidade do polinucleótido sintetizado no passo (b), possuindo o oligonucleótido molde uma primeira porção que emparelha com a segunda extremidade do polinucleótido e uma segunda porção possuindo a mesma sequência pré-determinada que a segunda porção do iniciador; e) extensão do polinucleótido sintetizado no passo (b) para proporcionar uma sua porção terminal que é complementar à sequência pré-determinada, em que o referido oligonucleótido molde não é estendido na sua extremidade 3'; e f) amplificação do polinucleótido estendido utilizando um único iniciador possuindo a sequência pré-determinada.

Está também contemplado que uma cadeia de ácido nucleico manipulado possuindo uma sequência pré-determinada na sua

primeira extremidade e uma sequência complementar à sequência pré-determinada na sua outra extremidade é ela própria um aspecto desta divulgação.

Noutro aspecto, esta divulgação proporciona um método de amplificar uma cadeia de ácido nucleico que inclui os passos de proporcionar uma cadeia de ácido nucleico manipulado possuindo uma sequência pré-determinada na sua primeira extremidade e uma sequência complementar à sequência pré-determinada na sua outra extremidade; e colocar em contacto a cadeia de ácido nucleico manipulado com um iniciador possuindo a sequência pré-determinada na presença de uma polimerase e nucleótidos em condições adequadas para a polimerização dos nucleótidos.

Os processos de amplificação e moldes manipulados aqui descritos podem ser utilizados para preparar produtos amplificados que podem ser ligados a um vector de expressão adequado. O vector pode ser então utilizado para transformar um organismo hospedeiro apropriado utilizando métodos convencionais para produzir o polipéptido ou proteína codificados pela sequência alvo. Em formas de realização particularmente úteis, as técnicas aqui descritas são utilizadas para amplificar uma família de sequências relacionadas para construir uma biblioteca complexa, tal como, por exemplo uma biblioteca de anticorpos.

#### **Breve Descrição das Figuras**

A Fig. 1 é uma ilustração esquemática de um iniciador e oligo de fronteira emparelhado com um molde;

A Fig. 2A é uma ilustração esquemática de um oligo de restrição emparelhado com uma cadeia de ácido nucleico;

A Fig. 2B é uma ilustração esquemática de um iniciador emparelhado com um molde que possui uma extremidade 5' encurtada;

A Fig. 3 é uma ilustração esquemática de uma forma de realização alternativa, em que são realizadas múltiplas rondas de polimerização e um oligonucleótido de restrição é emparelhado com as cadeias sintetizadas de novo, em vez de com o molde original;

A Fig. 4 é uma ilustração esquemática de um oligo interno emparelhado com uma cadeia de ácido nucleico sintetizada de novo;

A Fig. 5 é uma ilustração esquemática de um molde manipulado de acordo com esta divulgação;

A Fig. 6 é uma ilustração esquemática da amplificação de iniciador único de um molde manipulado;

A Fig. 7 apresenta a sequência do oligo interno designada TMX24CMnpt;

As Figs. 8a-e apresentam as sequências de Fab isolados produzidos no Exemplo 3; e

As Figs. 9a-d apresentam as sequências de Fab isolados produzidos no Exemplo 5.

## **Descrição Detalhada das Formas de Realização Preferidas**

A presente divulgação proporciona um método de amplificação de uma sequência de ácido nucleico alvo. Em formas de realização particularmente úteis, a sequência de ácido nucleico alvo é um gene que codifica um polipéptido ou proteína. A divulgação também descreve como os produtos da amplificação podem ser clonados e expressos em sistemas de expressão adequados. Em formas de realização particularmente úteis, as técnicas aqui descritas são utilizadas para amplificar uma família de sequências relacionadas para construir uma biblioteca complexa, tal como, por exemplo uma biblioteca de anticorpos.

A sequência de ácido nucleico alvo é amplificada exponencialmente através de um processo que envolve apenas um único iniciador. A capacidade para empregar um único iniciador (*i. e.*, sem a necessidade de ambos os iniciadores de sentido directo e reverso, possuindo cada um sequências diferentes) é alcançada manipulando uma cadeia de ácido nucleico que contém a sequência alvo a ser amplificada. A cadeia de ácido nucleico manipulada (por vezes aqui referido como o "molde manipulado") é preparada a partir de dois moldes; nomeadamente, 1) um material de partida que é um ácido nucleico natural ou sintético (*e. g.*, ADN ou ADNc) contendo a sequência a ser amplificada e 2) um oligonucleotídeo interno. O material de partida pode ser considerado o molde original. O oligonucleotídeo interno é utilizado como um molde para estender a sequência de nucleotídos do molde original durante a criação da cadeia de ácido nucleico manipulada. A cadeia manipulada de ácido nucleico é criada a partir do molde original por uma série de manipulações que resultam na presença de sequências complementares nas suas

extremidades opostas. São estas sequências complementares que permitem a amplificação utilizando apenas um único iniciador.

Qualquer ácido nucleico, na forma purificada ou não purificada, pode ser utilizado como o material de partida para os processos aqui descritos desde que contenha ou seja suspeito de conter, a sequência de ácido nucleico alvo a ser amplificada. Assim, o material de partida empregue no processo pode ser, por exemplo, ADN ou ARN, incluindo ARN mensageiro, cujo ADN ou ARN pode ser de cadeia simples ou de cadeia dupla. Adicionalmente, pode ser utilizado um híbrido de ADN-ARN que contém uma cadeia de cada um. Pode também ser empregue uma mistura de qualquer um destes ácidos nucleicos ou podem ser utilizados aqui os ácidos nucleicos produzidos a partir de uma reacção de amplificação prévia utilizando os mesmos iniciadores ou diferentes. A sequência de ácido nucleico alvo a ser amplificada pode ser uma fracção de uma molécula maior ou pode estar presente inicialmente como uma molécula discreta. O ácido nucleico de partida pode conter mais do que uma sequência de ácido nucleico alvo desejada que pode ser a mesma ou diferente. Por isso, o presente processo pode ser útil não apenas para produzir grandes quantidades de uma sequência de ácido nucleico alvo, mas também para amplificar simultaneamente mais do que uma sequência de ácido nucleico alvo diferente localizada na mesma ou em diferentes moléculas de ácido nucleico.

Os ácidos nucleicos podem ser obtidos a partir de qualquer fonte, por exemplo: bibliotecas genómicas ou de ADNc, plasmídeos, ADN clonado ou ARN ou a partir de ADN ou ARN natural de qualquer origem, incluindo bactérias, leveduras, vírus e organismos superiores, tais como plantas ou animais.

Os ácidos nucleicos podem ocorrer naturalmente ou podem ser sintéticos, quer totalmente ou em parte. As técnicas para obter e produzir os ácidos nucleicos utilizadas na presente invenção são bem conhecidas dos especialistas na técnica. Se o ácido nucleico contém duas cadeias, é necessário separar as cadeias do ácido nucleico antes de poder ser utilizado como o molde original, quer como um passo separado ou simultaneamente com a síntese dos produtos de extensão do iniciador. Adicionalmente, se o material de partida é a primeira cadeia de ADN, a segunda cadeia de ADN pode ser criada vantajosamente através de processos dentro das capacidades dos especialistas na técnica e utilizada como o molde original a partir do qual é criado o molde manipulado.

A primeira cadeia de ADNc é um molde particularmente útil para os presentes métodos. Métodos adequados para criar moldes de ADN são conhecidos dos especialistas na técnica e são rapidamente seleccionados por estes. Numa forma de realização preferida, a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc é sintetizada numa reacção em que a transcriptase reversa catalisa a síntese de ADN complementar a qualquer material de partida de ARN na presença de um oligodesoxinucleótido iniciador e os quatro trifosfatos de desoxinucleósido, dATP, dGTP, dCTP e TTP. A reacção é iniciada através do emparelhamento do oligodesoxinucleótido iniciador para a extremidade 3' do ARNm seguido pela adição passo a passo dos desoxinucleótidos apropriados, como determinado através de relações de emparelhamento de bases com a sequência de nucleótidos de ARNm para a extremidade 3' da cadeia em crescimento. Como os especialistas na técnica entenderão, pode ser utilizado todo o ARNm numa amostra para produzir a primeira cadeia de ADNc através do emparelhamento do oligo dT com a cauda poliA do ARNm.

Uma vez obtido o molde original, um iniciador 20 e um oligonucleótido 30 de fronteira são emparelhados com o molde 10 original. (Ver Fig. 1.). É polimerizada uma cadeia de ácido nucleico complementar à porção do molde original com início na extremidade 3' do iniciador até cerca da extremidade 5' do oligonucleótido de fronteira.

O iniciador 20 que é emparelhada com o molde original inclui uma primeira porção 22 da sequência pré-determinada que não emparelha, com o molde original e uma segunda porção 25 que emparelha com o molde original e, opcionalmente, inclui um sítio 23 de restrição entre a primeira e segunda porções. O iniciador emparelha com o molde original adjacente à sequência 12 alvo a ser amplificada. É contemplado que o iniciador possa emparelhar com o molde original a montante da sequência alvo a ser amplificada ou que o iniciador possa sobrepor-se no início da sequência 12 alvo a ser amplificada como apresentado na Fig. 1. A sequência pré-determinada da porção 22 do iniciador não emparelhada não é nativa no molde original e é seleccionada de modo a proporcionar uma sequência com que o iniciador único utilizado durante o processo de amplificação possa hibridar como descrito a seguir em detalhe. Opcionalmente, a sequência pré-determinada pode incluir um sítio de restrição útil para a inserção de uma porção do molde manipulado num vector de expressão como descrito mais pormenorizadamente a seguir.

O oligonucleótido 30 de fronteira que é emparelhado com o molde original serve para terminar a polimerização do ácido nucleico. Qualquer oligonucleótido capaz de terminar a polimerização do ácido nucleico pode ser utilizado como o oligonucleótido 30 de fronteira. Numa forma de realização

preferida, o oligonucleótido de fronteira inclui uma primeira porção 35 que emparelha com o molde 10 original e uma segunda porção 32 que não é susceptível de uma reacção de extensão. As técnicas para evitar que o oligo de fronteira actue como um sítio para extensão estão no alcance de um especialista na técnica. A título de exemplo, a porção 32 do oligo 30 de fronteira 30 pode ser concebida para que não emparelhe com o molde 10 original como apresentado na Fig. 1. Nestas formas de realização, o oligonucleótido 30 de fronteira evita polimerização adicional mas não serve como um iniciador para a síntese de ácido nucleico porque a sua extremidade 3' não hibrida com o molde 10 original. Alternativamente, a extremidade 3' do oligo de fronteira 30 pode ser concebida para incluir ácido nucleico trancado para obter o mesmo efeito. O ácido nucleico trancado é divulgado, por exemplo, no documento WO 99/14226. Os especialistas na técnica terão em mente outras formas de assegurar que não ocorre extensão da extremidade 3' do oligo de fronteira.

Os iniciadores e oligonucleótidos aqui descritos podem ser sintetizados utilizando métodos estabelecidos para a síntese de oligonucleótido que são bem conhecidos na técnica. Os oligonucleótidos, incluindo os iniciadores da presente invenção incluem oligómeros lineares de monómeros naturais ou modificados ou ligações, tal como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos e semelhantes, que são capazes de especificamente se ligar a um polinucleótido alvo através de um padrão regular de interacções monómero-para monómero, tal como o emparelhamento de bases de Watson-Crick. Normalmente, os monómeros são ligados através de ligações fosfodiéster ou seus análogos para formar oligonucleótidos que variam no tamanho desde poucas unidades monoméricas e. g., 3-4, a várias dezenas de unidades

monoméricas. Um iniciador é tipicamente de cadeia simples, mas pode ser de cadeia dupla. Os iniciadores são tipicamente ácidos desoxirribonucleicos, mas uma vasta variedade de iniciadores sintéticos e que ocorrem naturalmente conhecidos na técnica podem ser úteis para os métodos da presente divulgação. Um iniciador é complementar ao molde para o qual é concebido para hibridar, para servir como um sítio para o início da síntese, mas não precisa de reflectir a exacta sequência do molde. Neste caso, a hibridação específica do iniciador com o molde depende da restringência das condições de hibridação. Os iniciadores podem ser marcados com, e. g., unidades cromogénicas, radioactivas ou fluorescentes e utilizadas como unidades detectáveis.

A polimerização de ácido nucleico pode ser conseguida utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica. A polimerização é geralmente obtida enzimaticamente, utilizando uma polimerase de ADN que adiciona sequencialmente nucleótidos livres de acordo com as instruções do molde. Várias polimerases de ADN diferentes são adequadas para utilização no presente processo. Em certas formas de realização, o critério para a selecção inclui a ausência de actividade de exonuclease ou polimerases de ADN que não possuem uma exonuclease forte. As polimerases de ADN com baixa actividade de exonuclease para utilização no presente processo podem ser isoladas a partir de fontes naturais ou produzidas através de técnicas de ADN recombinante. Os exemplos ilustrativos de polimerases que podem ser utilizadas, são, sem limitação, a T7 Sequenase v. 2.0, o Fragmento Klenow da polimerase de ADN I que não possui actividade de exonuclease, o Fragmento Klenow da Taq Polimerase, exo.-Pfu ADN polimerase, Vent.(exo.-) ADN polimerase e Deep Vent. (exo-) ADN polimerase.

Numa forma de realização particularmente útil, a utilização de um oligonucleótido de fronteira é evitada por remoção de porções desnecessárias do material de partida por digestão. Nesta forma de realização, que é apresentada esquematicamente na Fig. 2A, um oligonucleótido de restrição 70 é emparelhado com o material de partida 100 numa localização pré-selecciónada. O oligonucleótido de restrição proporciona uma porção de cadeia dupla no material de partida contendo um sítio 72 de restrição. Os sítios de restrição adequados, incluem, mas não estão limitados a *Xho* I, *Spe* I, *Nhel*, *Hind* III, *Nco* I, *Xma* I, *Bgl* II, *Bst* I e *Pvu* I. Após exposição a uma enzima de restrição adequada, o material de partida é digerido e deste modo encurtado para remover sequência desnecessária embora conservando a sequência alvo desejada 12 (ou sua porção) a ser amplificada no que será utilizado como o molde 110 original. uma vez obtido o molde 110 original, um iniciador 20 é emparelhado com o molde 110 original (ver Fig. 2B) adjacente a ou em sobreposição com a sequência 12 alvo como descrito acima em ligação com formas de realização anteriores. Uma cadeia 40 de ácido nucleico complementar à porção do molde original entre a extremidade 3' do iniciador 20 e a extremidade 5' do molde 110 original é polimerizada. Como os especialistas na técnica compreendem, nesta forma de realização em que um oligonucleótido de restrição é empregue para produzir o molde original, não existe a necessidade de utilização de um oligonucleótido de fronteira, porque o iniciador de extensão pode ser deixado prosseguir até à extremidade 5' do molde 110 original encurtado.

Uma vez completa a polimerização (*i. e.*, o crescimento da cadeia 40 atinge o oligonucleótido 30 de fronteira ou a extremidade 5' do molde 110 original encurtado), a cadeia

complementar sintetizada de novo é separada do molde original por um método adequado de desnaturação incluindo meios físicos, químicos ou enzimáticos. A separação das cadeias pode também ser induzida por uma enzima da classe de enzimas conhecidas como helicases ou a enzima RecA, que possui actividade de helicase e na presença de riboATP é conhecida por desnaturar ADN. As condições de reacção adequadas para separar as cadeias de ácidos nucleicos com helicases são descritas por Cold Spring Harbor Symposia no *Quantitative Biology*, Vol. XLIII "DNA: Replication and Recombination" (Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978), B. Kuhn *et al.*, "DNA Helicases", pp. 63-67 e técnicas para utilização de RecA são revistas em C. Radding, *Ann. Rev. Genetics*, 16: 405-37 (1982).

A cadeia complementar sintetizada de novo inclui assim sequências proporcionadas pelo iniciador 20 (e. g., a sequência pré-determinada 22, o sítio 23 de restrição opcional e a porção de emparelhamento 25 do iniciador) assim como a porção 45 sintetizada de novo que é complementar da porção do molde 10 original entre a localização em que o iniciador 20 foi emparelhado com o molde 10 original e na porção do molde 10 original em que o oligonucleótido 30 de fronteira foi emparelhado ou a extremidade 5' do molde original encurtada. Ver Fig. 4.

Opcionalmente, rondas múltiplas de polimerização (de um modo preferido, 15-25 rondas) utilizando o molde original e um iniciador são efectuadas para produzir múltiplas cópias da cadeia complementar sintetizada de novo para utilização nos passos subsequentes. A preparação de múltiplas cópias da cadeia complementar sintetizada de novo neste ponto do processo (em vez de esperar até todo o molde manipulado ser produzido antes da

amplificação) ajuda a assegurar que cópias exactas da sequência alvo são incorporadas nos moldes manipulados produzidos por último. Crê-se que rondas múltiplas de polimerização com base no molde original proporciona uma maior semelhança de modo que será conseguida uma melhor representação de todos os membros da biblioteca, proporcionando deste modo uma maior diversidade em comparação com uma ronda única de polimerização.

Numa forma de realização alternativa, são produzidas cadeias sintetizadas de novo pelo emparelhamento do iniciador 20 como descrito acima com o molde 10 original e realizando múltiplas rondas de polimerização, sem a presença de um oligonucleótido bloqueante ou remoção de uma porção do molde original. Nesta forma de realização, que é apresentada esquematicamente na Fig. 3, o iniciador é estendido ao longo do comprimento total do molde original para proporcionar uma cadeia sintetizada 140 de novo de comprimento total. De seguida, um oligonucleótido 170 de restrição é hibridado com a cadeia sintetizada de novo de comprimento total. O oligonucleótido de restrição proporciona uma porção de cadeia dupla na cadeia sintetizada de novo contendo um sítio de restrição. Sítios de restrição adequados, incluem, mas não estão limitados a *Xho* I, *Spe* I, *Nhe* I, *Hind* III, *Nco* I, *Xma* I, *Bgl* II, *Bst* I, *Pvu* I, *Xcm* I, *BsaJ* I, *Hpa* I, *Apal* I, *Sac* I, *Dra* III e *Sma* I. Após exposição a uma enzima de restrição adequada, a cadeia sintetizada de novo é digerida e desse modo encurtada. Um oligonucleótido 50 interno pode ser então hibridado com a cadeia 142 sintetizada de novo encurtada para completar a preparação do molde manipulado, como descrito em mais detalhe abaixo.

O passo seguinte na preparação do molde manipulado envolve emparelhar um oligonucleótido 50 interno com a extremidade 3' da

cadeia complementar sintetizada de novo, por exemplo como apresentado na Fig. 4. Como observado na Fig. 4, o oligonucleótido 50 interno proporciona um molde para a posterior polimerização necessária para completar o molde manipulado. O oligonucleótido 50 interno inclui uma porção 52 que não hibrida e/ou inclui bases modificadas com uma cadeia complementar sintetizada de novo, prevenindo desse modo o oligonucleótido interno de servir como um iniciador. O oligonucleótido 50 interno também inclui uma porção 55 que hibrida com a extremidade 3' da cadeia complementar sintetizada de novo. A porção 55 pode ser co-terminada com a porção 45 sintetizada de novo ou pode estender-se para lá da porção 45 sintetizada de novo como apresentado na Fig. 4. O oligonucleótido 50 interno pode opcionalmente também incluir uma porção 56 definindo um sítio de restrição. A porção 58 final do oligonucleótido 50 interno contém a mesma sequência pré-determinada da porção 22 do iniciador 20. A partir do ponto em que a porção 55 se estende para lá da extremidade 3' do início da cadeia complementar sintetizada de novo, o oligonucleótido interno serve como um molde para polimerização adicional para formar o molde manipulado. Deve ser entendido que o oligo interno pode conter parte da sequência alvo (se parte desta foi truncada na formação do molde original) ou pode incluir genes que codificam um polipéptido ou proteína (ou sua porção) tal como, por exemplo, um ou mais CDR ou regiões Estruturais ou regiões constantes de um anticorpo. Está também contemplado que uma coleção de oligonucleótidos internos possuindo diferentes sequências possa ser empregue, proporcionando deste modo uma variedade de moldes que resulta numa biblioteca de diversos produtos. Deste modo, a polimerização estenderá a cadeia complementar sintetizada de novo pela adição de ácido nucleico 60 adicional que é complementar ao oligonucleótido interno como apresentado na

Fig. 4. As técnicas para conseguir uma polimerização estão na previsão dos especialistas na técnica. Como anteriormente apontado, a selecção de uma polimerase adequada, uma enzima sem actividade de exonuclease pode ser preferida em certas formas de realização.

Uma vez completa a polimerização, o molde 120 manipulado é separado do oligonucleótido 50 interno através de técnicas bem conhecidas dos especialistas na técnica, tal como, por exemplo, desnaturação pelo calor. O molde 120 manipulado resultante contém uma porção derivada do iniciador 20 original, porção 45 que é complementar a uma porção do molde original e porção 65 que é complementar a uma porção do oligonucleótido interno (ver Fig. 5). Significativamente, a extremidade 3' do molde 120 manipulado inclui a porção 68 contendo a sequência que é complementar à sequência pré-determinada da porção 22 do iniciador 20. Isto permite a amplificação da sequência desejada contida no molde 120 manipulado utilizando um único iniciador possuindo a mesma sequência da sequência pré-determinada da porção 22 do iniciador utilizando técnicas conhecidas dos técnicos da especialidade. Durante a amplificação com iniciador único, a presença de uma polimerase possuindo actividade de exonuclease é preferida porque estas enzimas são conhecidas por proporcionar uma função de "correcção" e possuem uma processividade relativamente maior em comparação com as polimerases sem actividade de exonuclease.

A Fig. 6 ilustra os passos envolvidos na amplificação de iniciador único do molde de ADNC sintetizado de novo. Quando o iniciador está presente na mistura de reacção híbrida com as sequências de flanco do molde e amplifica o molde. Quando não existe iniciador presente, crê-se que existe auto-emparelhamento

interno entre a extremidade 5' da sequência pré-determinada e a extremidade 3' da sequência que é complementar à sequência pré-determinada. Numa forma de realização preferida, a sequência pré-determinada e a complementar da sequência pré-determinada pode ser concebida para emparelhar a temperaturas mais elevadas de modo a evitar erros de iniciação durante a reacção de amplificação de iniciador único.

Após ter-se efectuada a amplificação, os produtos podem ser detectados utilizando qualquer das técnicas conhecidas dos especialistas na técnica. Exemplos de métodos utilizados para detectar ácidos nucleicos incluem, sem limitação, análise hibridação com oligonucleótidos específicos para alelos, clivagem com endonuclease de restrição, análise de polimorfismo conformacional de cadeia única (SSCP), electroforese em gel, coloração com brometo de etídeo, transferência de energia de ressonância e fluorescência, ensaio hairpin FRET e ensaio TaqMan.

Uma vez amplificado o ácido nucleico manipulado, num número de vezes desejado, os sítios 23 e 66 de restrição ou quaisquer sítios de restrição internos podem ser utilizados para digerir a cadeia de modo que a sequência de ácido nucleico alvo pode ser ligada num vector de expressão adequado. O vector pode então ser utilizado para transformar um organismo hospedeiro apropriado utilizando métodos convencionais para produzir o polipéptido ou proteína codificada pela sequência alvo.

Em formas de realização particularmente úteis, os métodos aqui descritos são utilizados para amplificar sequências alvo que codificam anticorpos ou suas porções, tal como, por exemplo, as regiões variáveis (cadeia leve ou pesada) utilizando ADNc de

um anticorpo. Deste modo, uma biblioteca de anticorpos pode ser amplificada e pesquisada. Deste modo, por exemplo, começando com ARNm de anticorpo, a primeira cadeia de ADNc pode ser produzida e digerida para proporcionar um molde original. Pode ser concebido um iniciador para emparelhar a montante com uma região determinante complementar seleccionada (CDR) de modo que a cadeia de ácido nucleico sintetizada de novo inclua o CDR. A título de exemplo, se a sequência alvo é CDR3 da cadeia pesada, o iniciador pode ser concebido para emparelhar com a região da estrutura um (FR1) da cadeia pesada. Os especialistas na técnica irão rapidamente prever como conceber iniciadores apropriados para emparelhar com outros sítios a montante ou para reproduzir outros alvos seleccionados no ADNc do anticorpo com base nesta divulgação.

Os Exemplos que se seguem são proporcionados para ilustrar, mas não limitar, a presente invenção(ções):

#### **EXEMPLO 1**

Amplificação de um repertório de genes variáveis de cadeia pesada de IgM

#### Síntese e modificação da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc

O ARNm de linfócitos do sangue periférico humano (PBL) foi utilizado para produzir a tradicional 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc com um iniciador oligo dT utilizando SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) essencialmente de acordo com as instruções do kit. O produto da primeira cadeia

de ADNC foi purificado com uma coluna de centrifugação da QIAGEN (PCR Purification Kit). Um oligonucleótido de restrição foi adicionado à primeira cadeia de ADNC de modo a produzir uma região de cadeia dupla de ADN que pode ser digerida pela endonuclease de restrição *EcoR I*. A sequência do oligonucleótido de restrição (CMEcoR I) foi 5'TCC TGT GAG AAT TCC CCG TCG 3'' (Seq. ID Nº 1). A reacção foi estabelecida com a 1ª cadeia de ADNC e 0,1 uM de oligonucleótido. A amostra foi aquecida a 95 °C durante 2 minutos e depois mantida a 64 °C durante dois minutos para permitir que ocorra o emparelhamento específico. Foi adicionada uma quantidade apropriada de tampão de restrição H 10X (Roche Diagnostics) à amostra e depois arrefecida a 37 °C. A endonuclease de restrição *EcoR I* (New England Biolabs) foi adicionada e incubada a 37 °C durante 30 minutos. A enzima de restrição foi inactivada por calor a 65 °C durante 20 minutos e depois a amostra foi arrefecida a 4 °C.

#### Amplificação Linear da 2ª Cadeia e Extensão com Oligo interno

A 1ª cadeia de ADNC digerida com *EcoR I* foi utilizada como o molde original numa reacção de 2ª cadeia de ADNC em conjunto com o iniciador "TMX24VH3a" (0,4 uM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção 10X (Applied Biosystems). O iniciador foi concebido para conter a sequência pré-determinada TMX24, um sítio de restrição *Xho I* e uma região que emparelha com a 1ª cadeia de ADNC na região de estrutura 1 dos genes da cadeia pesada de anticorpo humano A sequência de "TMX24VH3a" foi 5'GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG CTC GAG GAR GTG CAG CTG GTG GAG 3'' (Seq. ID Nº 2) em que R significa uma mistura equimolar de bases A e G. A amostra foi desnaturada por calor a 95 °C durante

1 minuto depois submetida a ciclos 20 vezes de 95 °C durante 5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto permite a amplificação linear da 2ª cadeia de ADNc. Um oligo interno designado "TMX24CM0" foi depois adicionado em gelo para uma concentração final de 0,08 uM. A sequência de "TMX24CM0" foi 5'GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG ACT AGT AAT TCT CAC AGG AGA CGA GGG GGA 3' (Seq. ID Nº 3), que contém um sítio Spe I de endonuclease de restrição a ser utilizado em subsequentes passos de clonagem. A extremidade 3' do oligo interno é concebida para evitar o alongamento através da incorporação de uma adenosina ligada de forma reversa (3'-3' em vez de 3'-5'). A 2ª cadeia de ADNc foi depois alongada para além do oligo interno por desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 5 segundos, depois submetida a ciclos 4 vezes para emparelhar e alongar a 68 °C durante 10 segundos e 95° durante 5 segundos, seguido por 68° durante 30 segundos e 4 °C. A 2ª cadeia de ADNc resultante ou molde manipulado foi depois purificada utilizando uma coluna de centrifugação da QIAGEN (PCR Purification Kit). Este passo remove os oligonucleótidos e permite a troca de tampão simples para os protocolos seguintes.

#### Amplificação com Iniciador Único (SPA)

O molde manipulado foi amplificado utilizando Advantage 2 polymerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção 10X, dNTP, e um iniciador único (TMX24) possuindo a sequência de 5'GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG 3' (Seq. ID Nº 4). As amostras foram desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto e depois submetidas a ciclos 35 vezes de 95° durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto foi deixado por mais 3 minutos a 68 °C e mantido a 4 °C.

## Clonagem e Sequenciação

Os produtos de amplificação de aproximadamente 450 pb foram purificados em gel e depois digeridos com *Xho* I e *Spe* I e clonadas no pBluescript KS+ (Stratagene). Os clones individuais foram repicados e a sua sequência de ADN foi determinada. Todos os 16 clones analisados foram de cadeia pesada de IgM, possuindo, cada um, diferentes sequências de CDR3 de comprimento variado indicando deste modo que uma diversa população de cadeias de anticorpo foi amplificada por este método (ver Tabela 1).

**Tabela 1**

	<u>FR3</u>	<u>HCDR3</u>	<u>FR4</u>
CLONE 1 (Seq. ID N° 5)	YYCAR	EGSSSGAFDI	WGQ
CLONE 2 (Seq. ID N° 6)	YYCAR	AAFYCSGGSCYFDYYYYGMDV	WGQ
CLONE 3 (Seq. ID N° 7)	YYCAK	DIGGLGVLNFDY	WGQ
CLONE 5 (Seq. ID N° 8)	YYCAK	GVLAIRICDY	WGQ
CLONE 6 (Seq. ID N° 9)	YYCAR	DPGVYDYVWGSYRPPDAFDI	WGQ
CLONE 7 (Seq. ID N° 10)	YYCAR	GMIVGATSYYPDY	WGQ
CLONE 8 (Seq. ID N° 11)	YYCLL	GYCSSTSCPDAFDI	WGQ
CLONE 9 (Seq. ID N° 12)	YYCVI	GGAVFSGGSYRQQIDY	WGQ
CLONE 10 (Seq. ID N° 13)	YYCTR	DRGGSYTSHLGAFDI	WGQ
CLONE 11 (Seq. ID N° 14)	YYCAK	DNDLGGDYYYYGMDV	WGQ
CLONE 12 (Seq. ID N° 15)	YYCAR	DRRFPTDLFDI	WGQ
CLONE 13 (Seq. ID N° 16)	YYCAR	EDGYNSGWSYNWFDP	WGQ
CLONE 14 (Seq. ID N° 17)	YYCAK	DCVSGSYHYFDY	WGQ
CLONE 16 (Seq. ID N° 18)	YYCAK	DSYCSGGSCYYYYGVDV	WGQ
CLONE 17 (Seq. ID N° 19)	YYCAR	EWPAAIIDYYYYGMDV	WGQ
CLONE 18 (Seq. ID N° 20)	YYCAK	DLGIAVWPAH	WGQ

## **EXEMPLO 2**

Para clonar os produtos VH num vector de modo que a região constante nativa CH1 de IgM pudesse ser reconstituída, foi utilizado um outro sítio para além de *EcoR I* em CH1 para a digestão da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc com endonuclease. Como os especialistas na técnica entenderão, quando é utilizada a Taq polimerase para este protocolo, é adicionado um terminal A a muitas das cadeias de ADN sintetizada de novo. De modo a maximizar a diversidade, a presença desse terminal A foi tomada em conta na concepção do oligonucleótido interno. Contudo, a presença desse A extra resulta na perda do sítio de reconhecimento *EcoR I*. A análise da região constante de IgM revelou outros sítios de restrição nativos que podem ser potencialmente utilizados para este método, tal como *Dra III*. O resultado da utilização do sítio de restrição *Dra III* nativo no domínio CH1 é que o sítio *EcoR I* a montante permanece não modificado e pode ser utilizado para clonagem do repertório de cadeia pesada. As inserções de cadeia pesada são clonadas por *Xho I* e *EcoR I* num vector apropriado que possui o domínio CH1 restante da IgM desde *EcoR I* até ao domínio CH2.

### Síntese e modificação da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc

O ARNm de linfócitos do sangue periférico humano (PBL) foi utilizado para produzir a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc tradicional com um iniciador oligo dT. Isto foi efectuado utilizando SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) de acordo essencialmente com as instruções do kit. Foi adicionado um oligonucleótido de restrição à primeira cadeia

de ADNC para produzir uma região de ADN de cadeia dupla que pode ser digerida pela endonuclease de restrição *Dra* III. A sequência do oligonucleótido de restrição (CMDra III) foi 5'GAC GAA CAC GTG GTG TGC AAA G 3' (Seq. ID N° 21). A reacção foi estabelecida com a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC e 1 uM de oligonucleótido. A amostra foi aquecida a 95 °C durante 2 minutos e depois mantida a 64 °C durante dois minutos para permitir que ocorra emparelhamento específico. Uma quantidade apropriada de tampão de restrição H 10X (Roche Diagnostics) foi adicionada à amostra e depois arrefecida a 37 °C. A endonuclease de restrição *Dra* III (New England Biolabs) foi adicionada e incubada a 37 °C durante 30 minutos. A enzima de restrição foi inactivada por calor a 65 °C durante 20 minutos e depois a amostra foi arrefecida a 4 °C.

#### Amplificação Linear da 2<sup>a</sup> cadeia e Extensão com Oligo Interno

A 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC digerida com *Dra* III foi utilizada como o molde original numa reacção de 2<sup>a</sup> cadeia de ADNC em conjunto com o iniciador "TMX24VHla" (0,4 uM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção 10X (Applied Biosystems). O iniciador foi concebido de modo a conter a sequência pré-determinada TMX24, um sítio de restrição *Xho* I e uma região que emparelha com a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC na região de estrutura 1 dos genes da cadeia pesada de anticorpo humano A sequência de "TMX24VHla" foi 5'GTGCTGGCCGTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCAGCTGGTGCAG 3' (Seq. ID N° 22) em que K significa uma mistura equimolar das bases G e T. A amostra foi desnaturada por calor a 94 °C durante 1 minuto e depois submetida a ciclos 20 vezes de 94 °C durante

5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc. Foi adicionado um oligo interno designado "TMX24CMnpt" em gelo a uma concentração final de 0,2 uM. Como apresentado na Fig. 7, a sequência de "TMX24CMnpt" (Seq. ID Nº 23) inclui três nucleótidos terminais 3' possuindo estruturas modificadas que foram concebidas para evitar o alongamento do oligonucleótido. Especificamente, o oligo interno possui três nucleótidos terminais modificados com fosforotioato e 2'OMe que é concebido para prevenir a extensão e proteger contra a actividade de exo e endonuclease. O nucleótido da extremidade 3' deste oligo é de não hibridação (g em vez de c). Os ADNc de 2<sup>a</sup> cadeia foram ainda alongados para fora do oligo interno por desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 1 minuto, emparelhados e alongados a 68 °C durante 2 minutos, seguido por 4 °C. O ADNc de 2<sup>a</sup> cadeia resultante ou molde manipulado foi depois limpo utilizando uma coluna de centrifugação da QIAGEN (PCR Purification Kit). Este passo remove os oligonucleótidos e permite a troca de tampão simples para protocolos a jusante. Este processo foi repetido e estendido para o resto do painel de iniciadores VH (ver lista de iniciadores) para produzir uma biblioteca de produtos de imunoglobulina que pode ser clonada num vector apropriado.

**Iniciadores Específicos para a Estrutura 1 de VH:**

INICIADOR TMX24VH1a (Seq. Id Nº: 25)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTKCAGCTGGTGCAG**

INICIADOR TMX24VH1b (Seq. Id Nº: 26)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCCAGCTTGTGCAG**

INICIADOR TMX24VH1c (Seq. Id N°: 27)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGSAGGTCCAGCTGGTACAG**

INICIADOR TMX24VH1d (Seq. Id N°: 28)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCARATGCAGCTGGTGCAG**

INICIADOR TMX24VH2a (Seq. Id N°: 29)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGATCACCTGAAGGAG**

INICIADOR TMX24VH2b (Seq. Id N°: 30)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACACCTTGARGGAG**

INICIADOR TMX24VH3a (Seq. Id N°: 31)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGGAG**

INICIADOR TMX24VH3b (Seq. Id N°: 32)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTGGTGGAG**

INICIADOR TMX24VH3c (Seq. Id N°: 33)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGAGGTGCAGCTGTTGGAG**

INICIADOR TMX24VH4a (Seq. Id N°: 34)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGSTGCAGCTGCAGGAG**

INICIADOR TMX24VH4b (Seq. Id N°: 35)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTACAGCAG**

INICIADOR TMX24VH5a (Seq. Id N°: 36)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGCAG**

INICIADOR TMX24VH6a (Seq. Id N°: 37)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACAGCTGCAGCAG**

INICIADOR TMX24VH7a (Seq. Id N°: 38)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTSCAGCTGGTGCAA**

Nas sequências anteriores, R é uma mistura igual de A e G, K é uma mistura igual de G e T, e S é uma mistura igual de C e G.

Amplificação de Iniciador Único (SPA)

O molde manipulado foi amplificado utilizando Advantage 2 polimerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção 10X, dNTP e um único iniciador (TMX24) possuindo a sequência 5'GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG 3' (Seq. ID N° 4). As amostras foram desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto depois submetidas a 30 ciclos de 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Estas foram deixadas durante 3 minutos adicionais a 68 °C e mantidas a 4 °C.

Clonagem e Sequenciação

Os produtos de amplificação de aproximadamente 450 pb são purificados em gel e digeridos por *Xho* I e *Eco* RI. As inserções são clonadas em qualquer vector de expressão adequado contendo a porção restante do domínio CH1 de IgM do sítio *Eco* RI nativo até, ou incluindo, uma porção de, o domínio CH2 e um sítio de restrição compatível para clonar os fragmentos de amplificação.

### **EXEMPLO 3**

Construção de uma biblioteca de apresentação de fagemídeos de ARNm de um dador positivo para a Hepatite B.

#### Síntese e modificação da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc para as Cadeias Pesada e Kapa Leve de IgG

O ARNm de linfócitos do sangue periférico humano (PBL) de um dador vacinado com Hepatite B foi utilizado para produzir ADNc da 1<sup>a</sup> cadeia tradicional com um iniciador oligo dT. Isto foi realizado utilizando SuperScript First-Strand Synthesis System para RT-PCR (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES) de acordo essencialmente com as instruções do kit. O oligonucleotídeo de restrição "CGApaL I" para IgG ou "CKSac I" para a cadeia kapa leve foi adicionado à primeira cadeia de ADNc de modo a produzir uma região de ADN de cadeia dupla que pode ser digerida pela endonuclease de restrição ApaL I para IgG ou Sac I para a cadeia kapa leve. A sequência "CGApaL I" é 5'CCA GCG GCG TGC ACA CCT TCC3' (Seq. ID Nº 39). A sequência "CKSac I" é 5'AGG GCC TGA GCT CGC CCG TC 3' (Seq. ID Nº 40). A reacção foi preparada com ADNc da 1<sup>a</sup> cadeia, 1 µM de oligonucleotídeo, e quantidade apropriada do tampão de restrição A, a 10X (Roche Diagnostics). A amostra foi aquecida a 95 °C durante 2 minutos e depois mantida a 64 °C durante dois minutos para permitir que ocorra emparelhamento específico e arrefecida a 37 °C. A endonuclease de restrição ApaL I ou Sac I (New England Biolabs) foi adicionada e incubada a 37 °C durante 30 minutos. A enzima de restrição foi inactivada pelo calor para Sac I a 65 °C durante 20 minutos e depois a amostra foi arrefecida a 4 °C.

A digestão dos ADNC da 1<sup>a</sup> cadeia por cada endonuclease de restrição foi verificada por amplificação por PCR utilizando técnicas conhecidas dos especialistas na técnica. Estes produtos não foram utilizados para clonagem dos genes de anticorpo. A amplificação positiva da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC digerida foi observada em reacções utilizando o 5'VBVH1a e o iniciador de controlo interno 3'CG0 para IgG e 5'VBVK1a e o iniciador de controlo interno 3'CK0 para kapa. A boa amplificação com os iniciadores 5'VBVH1a/3'CG0 ou 5'VBVK1a/3'CK0 e a amplificação mínima com os iniciadores 5'VBVH1a/3'CG1z ou 5'VK1a/3'CK1dx2 indicam a digestão bem sucedida da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC molde com cada endonuclease de restrição. As sequências dos iniciadores utilizados para verificar a PCR foram VBVH1a: 5'GAG CCG CAC CAG CCC CTC GAG CAG GTK CAG CTG GTG CAG 3' (Seq. ID N° 41), CG0: 5' GRG CGC CTG AGT TCC ACG ACA CCG 3' (Seq. ID N° 42), VBVK1a: 5' GAC GCG CAC AAC ACG GAG CTC RAC ATC CAG ATG ACC CAG 3' (Seq. ID N° 43), CK0: 5' GTG ACT TCG CAG GCG TAG ACT T 3' (Seq. ID N° 44), CG1z: 5' GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG 3' (Seq. ID N° 45), CK1dx2: 5' AGA CAG TGA GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA G 3' (Seq. ID N° 46).

#### Amplificação Linear da 2<sup>a</sup> Cadeia da Cadeia Leve e Extensão do Oligo Interno

Foi utilizada a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC da digerida com *Sac* I como o molde original para preparar múltiplas reacções da 2<sup>a</sup> cadeia de ADNC utilizando um iniciador específico da estrutura 1 (0,4 µM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção a 10X (Applied Biosystems). Os iniciadores foram concebidos para conterem a sequência pré-determinada TMX24K 5'GAC GAC CGG CTA

CCA AGA GGA GTG 3' (Seq. ID N° 47) para kapa, um sítio de restrição Xba I e uma região que emparelha com a 1ª cadeia de ADNc na região de estrutura 1 dos genes da cadeia leve kapa de anticorpo humano. Estas sequências que emparelham foram derivadas dos iniciadores da base de dados VBase ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html)) que foram concebidos com base nas sequências conhecidas de anticorpos humanos e são relatadas como cobrindo o repertório inteiro de genes da cadeia leve kapa de anticorpos humanos.

#### Iniciadores Específicos da Estrutura 1 da Cadeia Leve Kapa:

TMX24V<sub>k1a</sub> (Seq. ID N° 48) Xba I

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGARACATCCAGATGACCCAG

TMX24V<sub>k1b</sub> (Seq. ID N° 49)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGMCATCCAGTTGACCCAG

TMX24V<sub>k1c</sub> (Seq. ID N° 50)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGCCATCRGATGACCCAG

TMX24V<sub>k1d</sub> (Seq. ID N° 51)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGTCATCTGGATGACCCAG

TMX24V<sub>k2a</sub> (Seq. ID N° 52)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATATTGTGATGACCCAG

TMX24V<sub>k2b</sub> (Seq. ID N° 53)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATRTTGTGATGACTCAG

TMX24V<sub>k3a</sub> (Seq. ID N° 54)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGTTGACRCAG

TMX24V<sub>k3b</sub> (Seq. ID N° 55)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGTTGACGCAG

TMX24V<sub>k3c</sub> (Seq. ID N° 56)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTAATGACACAG

**TMX24vk4a (Seq. ID № 57)**

**GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATCGTGATGACCCAG**

**TMX24vk5a (Seq. ID № 58)**

**GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAACGACACTCACGCAG**

**TMX24vk6a (Seq. ID № 59)**

**GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGCTGACTCAG**

**TMX24vk6b (Seq. ID № 60)**

**GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATGTTGTGATGACACAG**

Nas sequências anteriores, R é uma mistura igual de A e G, M é uma mistura igual de A e C, Y é uma mistura igual de C e T, W é uma mistura igual de A e T, e S é uma mistura igual de C e G.

As amostras foram desnaturadas por calor a 94 °C durante 1 minuto depois submetidas a ciclos 20 de vezes de 94 °C durante 5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2ª cadeia de ADNc. Um oligo interno designado "TMX24CKnpt" para as cadeias kapa foi adicionado em gelo a uma concentração final de 0,2 µM. "TMX24CKnpt" contém a sequência pré-determinada TMX24K e a sequência foi 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG CTC GAG CTC AGG CCC TGA TGG GTG ACT TCG CT 3' (Seq. ID № 61). A 2ª cadeia de ADNc foi depois alongada para lá do oligo interno por desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 1 minuto, emparelhada e alongada a 68 °C durante 2 minutos, seguido por 4 °C. A 2ª cadeia de ADNc resultante (molde manipulado) foi purificada utilizando uma coluna QIAGEN spin (PCR Purification Kit). Este passo remove os oligonucleótidos livres e permite a troca de tampão simples para protocolos de purificação.

### Amplificação do Iniciador Simples de Cadeia Leve (SPA)

O molde manipulado foi amplificado utilizando a mistura de polimerase Advantage 2 (Clontech) e o seu tampão de reacção a 10X, dNTP e o iniciador "TMX24K" para as cadeias kapa. A sequência para "TMX24K" é 5'GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG 3' (Seq. ID N° 62). As amostras foram desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto, depois, submetidas a 30 ciclos de 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto foi seguido por 3 minutos adicionais a 68 °C e a 4 °C para manter.

### Clonagem da Cadeia Leve

Os produtos de amplificação de kapa foram purificados em gel e depois digeridos por *Xba* I e *Sac* I. As inserções foram clonadas num vector de expressão adequado que contém a porção restante da região constante da cadeia leve kapa. O produto ligado foi introduzido numa *E. coli* por electroporação e cultivada de um dia para ou outro a 37 °C. Na manhã seguinte, foi realizada uma maxi prep de ADN (QIAGEN) para recuperar o ADN da biblioteca de cadeia leve. O ADN da biblioteca de cadeia leve foi depois utilizado em passos subsequentes para clonar nos fragmentos Fd da cadeia pesada Fd por *Xho* I/*Age* I para completar a construção da biblioteca.

### Amplificação Linear da 2ª Cadeia da Cadeia Pesada e Extensão do Oligo Interno

A 1ª cadeia de ADNc digerida com *Apa*L I foi utilizada como o molde original para preparar múltiplas reacções da 2ª cadeia de ADNc utilizando um iniciador específico para a estrutura 1

(0,4 µM final), dNTP, enzima AmpliTaq e seu tampão de reacção a 10X (Applied Biosystems). Os iniciadores foram concebidos para conterem a sequência pré-determinada TMX24, um sítio de restrição *Xho* I e uma região que emparelha com a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc na região de estrutura 1 dos genes da cadeia pesada de anticorpos humanos. Aquelas sequências que emparelham foram derivadas da base de dados de iniciadores VBase que foram concebidas com base nas sequências conhecidas de anticorpos humanos e são relatadas como cobrindo o repertório de genes de cadeia pesada de todo o anticorpo humano

**Iniciadores Específicos da Estrutura 1 da Cadeia Pesada:**

**TMX24VH1a (Seq. ID Nº 63)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTKCAGCTGGTCAG**

**TMX24VH1b (Seq. ID Nº 64)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCCAGCTGTGCAG**

**TMX24VH1c (Seq. ID Nº 65)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGSAGGTCCAGCTGGTACAG**

**TMX24VH1d (Seq. ID Nº 66)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCARATGCAGCTGGTCAG**

**TMX24VH2a (Seq. ID Nº 67)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGATCACCTGAAGGAG**

**TMX24VH2b (Seq. ID Nº 68)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACCTTGARGGAG**

**TMX24VH3a (Seq. ID Nº 69)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGGAG**

**TMX24VH3b (Seq. ID Nº 70)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTGGTGGAG**

**TMX24VH3c (Seq. ID Nº 71)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGAGGTGCAGCTGTTGGAG**

**TMX24VH4a (Seq. ID Nº 72)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGSTGCAGCTGCAGGAG**

**TMX24VH4b (Seq. ID Nº 73)**

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTACAGCAG**

TMX24VH5a (Seq. ID Nº 74)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGCAG**

TMX24VH6a (Seq. ID Nº 75)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACAGCTGCAGCAG**

TMX24VH7a (Seq. ID Nº 75)

**GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTSCAGCTGGTGCAA**

Nas sequências anteriores, R é uma mistura igual de A e G, K é uma mistura igual de G e T e S é uma mistura igual de C e G.

As amostras foram desnaturadas por calor a 94 °C durante 1 minuto, depois submetidas a 20 ciclos de 94 °C durante 5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2ª cadeia de ADNc. Um oligonucleótido interno designado "TMX24CGnpt" (sequência 5'GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG TGT TTG CAC GCC GCT GGT CAG RGC GCC TGA GTT G 3' (Seq. ID Nº 77)) foi adicionado no gelo para uma concentração final de 0,2 µM. Como apresentado na Fig. 1 para o oligo interno de IgM, os três nucleótidos 3' terminal foram modificados para prevenir a extensão de oligo. A 2ª cadeia de ADNc foram ainda alongadas para fora do oligo interno para a desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 1 minuto, emparelhamento e alongamento a 68 °C durante 2 minutos, seguido por 4 °C. A 2ª cadeia de ADNc resultante (o molde manipulado) foi depois purificado utilizando uma coluna QIAGEN spin (PCR Purification Kit). Este passo removeu os oligonucleótidos livres e permitiu a troca de tampão simples para protocolos a jusante.

Amplificação de Iniciador Simples (SPA)

O molde manipulado foi amplificado utilizando Advantage 2 polimerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção a 10X, dNTP,

e o iniciador "TMX24". As amostras foram desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto, depois submetidas a 30 ciclos de 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto foi seguido por 3 minutos adicionais a 68 °C e uma manutenção a 4 °C.

#### Clonagem da Cadeia Pesada & Produção da Biblioteca

Os produtos amplificados foram reunidos e depois purificados em gel. O ADN foi recuperado com o QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). O ADN foi sequencialmente digerido com as enzimas de restrição *Xho* I e *Age* I e depois purificados em gel. O sítio *Age* I está naturalmente presente na região constante CH1 de IgG a montante do sítio *Apa*L I. O ADN foi recuperado com QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN).

O ADN da biblioteca da cadeia leve foi digerido sequencialmente com *Xho* I e *Age* I e depois purificado em gel. O ADN da biblioteca da cadeia leve foi ligado aos fragmentos da cadeia pesada. O ADN ligado foi colocado sobre uma coluna de centrifugação (PCR purification Kit, QIAGEN) para remover o tampão de reacção e para concentrar o ADN. A transformação final foi realizada em células XL-1 Blue electrocompetentes (Stratagene).

#### Seleção e Rastreio de Biblioteca em HBs Ag

A biblioteca foi seleccionada em HBs Ag imobilizado durante 4 rondas, essencialmente como descrito em Barbas III, CF, Burton, DR, Scott, JK e Silverman, GJ (2001) "Phage Display: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, Nova Iorque. Os clones individuais das 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, e 4<sup>a</sup> rondas de selecção foram rastreados por ELISA em HBs Ag.

Síntese da 1<sup>a</sup> Cadeia de ADNc e Modificação para a Cadeia Leve de Lambda.

O ARN, de PBL humanos de um dador vacinado para a Hepatite B foi utilizado para produzir a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc tradicional com um iniciador oligo dT. Isto foi realizado utilizando SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES) essencialmente de acordo com as instruções do kit. O oligonucleótido de restrição "CLSma I" foi adicionado à primeira cadeia de ADNc de modo a produzir uma região do ADN de cadeia dupla que pode ser digerido pela endonuclease de restrição *Sma* I. A sequência de "CLSma I" é 5'GAC TTC TAC CCG GGA GCY GTG3' (Seq. ID Nº 78) em que Y é uma mistura de C e T. A reacção foi preparada com a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc, 1 µM de oligonucleótido e quantidade apropriada de tampão de restrição A a 10X (Roche Diagnostics). A amostra foi aquecida a 95 °C durante 2 minutos e depois mantida a 64 °C durante dois minutos para permitir que ocorra emparelhamento específico e arrefecida a 37 °C. A endonuclease de restrição *Sma* I (New England Biolabs) foi adicionada e incubada a 37 °C durante 30 minutos. A enzima de restrição foi inactivada por calor a 65 °C e depois a amostra foi arrefecida a 4 °C.

A digestão da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc por endonuclease de restrição foi verificada por amplificação por PCR utilizando técnicas conhecidas dos especialistas na técnica. Estes produtos não foram utilizados para clonagem dos genes de anticorpo. A amplificação positiva da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc digerida foi

observada na reacção utilizando o 5'VBVL1a e o iniciador de controlo interno 3'CL0. Boa amplificação com os iniciadores 5'VBVL1a/3'CL0 e amplificação mínima com os iniciadores 5'VBVL1a/3'CL2dx2 indicou digestão bem sucedida da 1ª cadeia de ADNc molde com *Sma* I. As sequências dos iniciadores para verificar o PCR foram VBVL1a 5'GAC GCG CAC A AC ACG GAG CTC CAG TCT GTG CTG ACT CAG 3' (Seq. ID N° 79), CL0 5'CCT CAG AGG AGG GYG GG A ACAG 3' (Seq. ID N° 80) e CL2dx2 5' AGA CAG TGA CGC CGT CTA GAA TTA TGA ACA TTC TGT AGG 3' (Seq. ID N° 81).

#### Amplificação Linear da 2ª Cadeia Leve Lambda e Extensão do Oligo Interno

A 1ª cadeia de ADNc digerida com *Sma* I foi utilizada como molde original para estabelecer reacções múltiplas de 2ª cadeia de ADNc utilizando um iniciador específico da estrutura 1 (0,4 uM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção 10X (Applied Biosystems). Os iniciadores são concebidos para conter a sequência pré-determinada TMX24L, um sítio *Xba* I, e uma região que emparelha com a 1ª cadeia de ADNc na região de estrutura dos genes de cadeia leve lambda de anticorpo humano. Estas sequências de emparelhamento são derivadas dos iniciadores da base de dados VBase ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imtdoc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imtdoc/public/INTRO.html)) que são concebidos com base nas sequências conhecidas dos anticorpos humanos e são reportados como cobrindo todo o repertório de genes de cadeia leve lambda de anticorpo humano. Os iniciadores específicos para a estrutura 1 de cadeia leve lambda são os utilizados no Exemplo 4.

As amostras foram desnaturadas por calor a 94 °C durante 1 minuto e depois submetidas a ciclos 20 vezes a 94 °C durante

5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc. Um oligo interno nucleótido designado "TMX24CLnpt" como apresentado no Exemplo 4 foi adicionado em gelo para uma concentração final de 0,2 uM. Como apresentado na Fig. 7 para o oligonucleótido interno "TMX24CMnpt" de IgM, os nucleótidos 3' terminais de "TMX24CLnpt" são modificados para evitar a extensão do oligo. As 2<sup>a</sup>s cadeias de ADNc foram depois alongadas para além do oligonucleótido interno por desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 1 minuto, emparelhamento e alongamento a 68 °C durante 2 minutos, seguido por 4 °C. As 2<sup>a</sup>s cadeias de ADNc resultantes (o molde manipulado) foram purificadas utilizando o PCR Purification Kit (QIAGEN). Este passo remove os oligonucleótidos livres e permite a troca de tampão simples para protocolos subsequentes.

#### Amplificação com Iniciador Único (SPA) da Cadeia Leve Lambda

O molde manipulado foi amplificado utilizando Advantage 2 polymerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção 10x buffer, dNTP, e o iniciador "TMX24L". A sequência pré-determinada de TMX24L é 5'GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG3' (Seq. ID N° 82). As amostras foram desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto depois submetidas a ciclos 30 vezes a 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto foi seguido por mais 3 minutos a 68 °C e uma espera a 4 °C.

### Clonagem da Cadeia Leve Lambda

Os produtos de amplificação da cadeia leve lambda foram purificados pelo kit de purificação de PCR (QIAGEN) e digeridos por *Xba* I e *Sac* I. A inserção foi purificada em gel utilizando um kit de extracção de gel (QIAGEN) e clonada num vector apropriado que contém a restante porção da região constante da cadeia leve de lambda. O produto ligado foi introduzido numa *E. coli* por electroporação e cultivado de um dia para o outro a 37 °C. Na manhã seguinte foi efectuada uma maxi prep de ADN (QIAGEN) para recuperar o ADN da biblioteca da cadeia leve lambda.

### Clonagem da Cadeia Pesada & Produção da Biblioteca de Lambda de IgG

O ADN da biblioteca de cadeia leve lambda preparada acima foi sequencialmente digerida por *Xho* I e *Age* I para a inserção dos fragmentos Fd da cadeia pesada, preparada também para a biblioteca de kapa de IgG como descrito anteriormente. O produto ligado foi depois introduzido numa *E. coli* por electroporação e cultivado de um dia para o outro a 37 °C. Na manhã seguinte foi efectuada uma maxi prep de ADN (QIAGEN) para recuperar o ADN completo da biblioteca de lambda de IgG.

### Selecção e Pesquisa da Biblioteca em HB Ag

A selecção e pesquisa foram efectuadas como descrito anteriormente para a biblioteca de kapa de IgG.

Análise de sequenciação de ADN e Caracterização de Fab Isolados.

Os clones que apresentam a ligação específica a HBsAg e ligação mínima a uma proteína não específica, ovalbumina, por pesquisa de ELISA, foram analisados através de sequenciação de ADN. Ver Figs. 8a-e. Foi isolado um total de 38 Fab kapa de IgG distintos (25 cadeias pesadas e 37 cadeias leves) e 17 Fab lambda de IgG distintos (13 cadeias pesadas e 16 cadeias leves) para HBsAg a partir das bibliotecas preparadas de ARNm de PBL de um dador vacinado contra a Hepatite B.

**EXEMPLO 4**

Construção de uma biblioteca de exposição de anticorpos em fagos do ARNm de PBL humano

Síntese e Modificação da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc para Cadeias Leves

O ARNm de PBL humano de um dador foi utilizado para produzir a tradicional 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc com um iniciador oligo dT utilizando SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) essencialmente de acordo com as instruções do kit. As reacções de cadeia leve kapa e lambda são estabelecidas separadamente. O oligonucleótido de restrição "CKSac I" ou "CLSma I" é adicionado à primeira cadeia de ADNc de modo a produzir uma região de cadeia dupla de ADN que pode ser digerido pela endonuclease de restrição Sac I para a cadeia leve kapa ou Sma I para lambda. Como existem múltiplas regiões

constantes lambda (C1, C2, C3 e C6) é importante notar que o sítio *Sma* I é conservado entre todos os domínios constantes de lambda funcionais (C1, C2, C3 e C6). A sequência "CKSac I" é 5'AGG GCC TGA GCT CGC CCG TC 3' (Seq. ID Nº 179), a sequência "CLSma I" é 5'GAC TTC TAC CCG GGA GCY GTG 3' (Seq. ID Nº 180) em que Y é uma mistura de C e T. As reacções são estabelecidas com a 1ª cadeia de ADNc e oligonucleótido a 1 uM. A amostra é aquecida a 95 °C durante 2 minutos e depois mantida a 64 °C durante dois minutos para permitir que ocorra emparelhamento específico. Uma quantidade apropriada de tampão de restrição A 10X (Roche Diagnostics) é adicionada às amostras e depois arrefecida a 37 °C. As endonuclease de restrição *Sac* I ou *Sma* I (New England Biolabs) são adicionadas e incubadas a 37 °C durante 30 minutos. A enzima de restrição é inactivada por calor a 65 °C durante 20 minutos e depois a amostra é arrefecida a 4 °C.

#### Amplificação Linear da 2ª Cadeia da Cadeia Leve e Extensão com Oligo interno

A 1ªcadeia de ADNc de kapa digerida com *Sac* I ou a 1ªcadeia de ADNc de lambda digerida com *Sma* I são utilizadas como moldes originais para estabelecer reacções múltiplas de 2ª cadeia de ADNc utilizando um iniciador específico da estrutura 1 (0,4 uM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção 10X (Applied Biosystems). Os iniciadores são concebidos para conter a sequência TMX24K (para kapa) ou TMX24L (para lambda), um sítio de restrição *Xba* I e uma região que emparelha com a 1ª cadeia de ADNc na região da estrutura 1 dos genes da cadeia kapa ou lambda de anticorpo humano. Estas sequências de emparelhamento são derivadas da base de dados de iniciadores VBase

([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html)) que são concebidas com base nas sequências conhecidas de anticorpos humanos e são reportadas para cobrir todo o repertório de genes de cadeia leve do anticorpo humano. Os iniciadores específicos da estrutura 1 da cadeia leve kapa são os utilizados no Exemplo 3. Ver a seguinte lista de iniciadores para utilização na amplificação de lambda.

**Iniciadores Específicos para a Estrutura 1 da cadeia Leve Lambda:**

**TMX24VL1a** (Seq. ID Nº 181)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGTGCTGACTCAG

**TMX24VL1b** (Seq. ID Nº 182)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGTGYTGACGCAG

**TMX24VL1C** (Seq. ID Nº 183)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGTGCGTACGCAG

**TMX24VL2** (Seq. ID Nº 184)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGCCCTGACTCAG

**TMX24VL3a** (Seq. ID Nº 185)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCCTATGWGCTGACTCAG

**TMX24VL3b** (Seq. ID Nº 186)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCCTATGGAGCTGACACAG

**TMX24VL3c** (Seq. ID Nº 187)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCTTCTGGAGCTGACTCAG

**TMX24VL3d** (Seq. ID Nº 188)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCCTATGGAGCTGATGCAG

**TMX24VL4** (Seq. ID Nº 189)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGCYTGTGCTGACTCAA

**TMX24VL5** (Seq. ID Nº 190)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGSCTGTGCTGACTCAG

**TMX24VL6** (Seq. ID Nº 191)  
**GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGAAATTTATGCTGACTCAG**

**TMX24VL7** (Seq. ID Nº 192)  
**GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGRCTGTGGTACTCAG**

**TMX24VL8** (Seq. ID Nº 193)  
**GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGACTGTGGTACCCAG**

**TMX24VL4/9** (Seq. ID Nº 194)  
**GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACWGCGCTGTGCTGACTCAG**

**TMX24VL10** (Seq. ID Nº 195)  
**GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGGGCAGGGCTGACTCAG**

Nas sequências anteriores, R é uma mistura igual de A e G, M é uma mistura igual de A e C, Y é uma mistura igual de C e T, W é uma mistura igual de A e T, e S é uma mistura igual de C e G.

As amostras são desnaturadas por calor a 94 °C durante 1 minuto, depois submetida a ciclos 20 vezes a 94 °C durante 5 segundos, 56 °C durante 10 segundos, e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2ª cadeia de ADNc. Um oligonucleótido interno designado "TMX24CKnpt" para cadeias kapa ou "TMX24CLnpt" para cadeias lambda é adicionado em gelo para uma concentração final de 0,2 uM. As sequências de oligonucleótido interno são; "TMX24CKnpt" 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG CTC GAG CTC AGG CCC TGA TGG GTG ACT TCG CT 3' (Seq. ID Nº 196) e "TMX24CLnpt" 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG AAG AGC TCC TGG GTA GAA GTC ACT KAT SAG RCA CAG 3' (Seq. ID Nº 197). Como apresentado na Fig. 7 para o oligo interno de IgM, os três nucleótidos 3' terminais são modificados para evitar a extensão do oligo. As 2ªs cadeias de ADNc são depois alongadas além dos oligos internos por desnaturação por aquecimento a 94 °C 1 minuto, emparelhamento e alongamento a 68 °C durante 2 minutos, seguido por 4 °C. A 2ª cadeia de ADNc resultante (os moldes manipulados) é purificada

utilizando uma coluna de centrifugação QIAGEN (PCR Purification Kit). Este passo remove os oligonucleótidos livres e permitem uma troca de tampão simples para protocolos subsequentes.

#### Amplificação com Iniciador Único (SPA) da Cadeia Leve

O molde manipulado é amplificado utilizando Advantage 2 polymerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção 10X, dNTP, e o iniciador "TMX24K" para cadeias kapa ou "TMX24L" para cadeias lambda. A sequência para "TMX24K" é 5'GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG 3' (Seq. ID Nº 198) e para "TMX24L" é 5'GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG 3' (Seq. ID Nº 199). As amostras são desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto, depois submetida a ciclos 30 vezes a 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto é seguido por mais 3 minutos a 68 °C e manutenção a 4° C.

#### Clonagenm da Cadeia Leve

Os produtos de amplificação Kapa e Lambda foram purificados utilizando um kit de purificação de PCR (QUIAGEN) e foram separadamente purificados em gel. Estes produtos são digeridos por *Xba* I e *Sac* I. As inserções são clonadas num vector apropriado que contém a restante porção da respectiva região constante da cadeia leve. O produto ligado é introduzido em *E. coli* por electroporação e cultivado de um dia para o outro a 37 °C. na manhã seguinte foi efectuada uma maxiprep de ADN para recuperar o ADN da biblioteca da cadeia leve. As preparações da biblioteca de ADN da cadeia leve são utilizadas como o vector de

clonagem para inserção dos fragmentos Fd da cadeia pesada por *Xho* I/*EcoR* I para completar a construção da biblioteca.

### Síntese e Modificação da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC para Cadeias Pesadas

O ARNm de PBL humano de um dador é utilizado para produzir a tradicional 1<sup>a</sup>cadeia de ADNC com um iniciador oligo dT. Isto é efectuado utilizando o SuperScript First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) essencialmente de acordo com as suas instruções. O oligonucleótido de restrição *CMDra* III é adicionado à primeira cadeia de ADNC de modo a produzir uma região de cadeia dupla de ADN que pode ser digerida pela endonuclease de restrição *Dra* III. A reacção é estabelecida com a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC e oligonucleótido a 1 uM. A amostra é aquecida a 95 °C durante 2 minutos e depois mantida a 64 °C durante dois minutos para permitir que ocorra emparelhamento específico. Uma quantidade apropriada de tampão de restrição H 10X (Roche Diagnostics) é adicionada à amostra e depois arrefecida a 37 °C. A endonuclease de restrição *Dra* III (New England Biolabs) é adicionada e incubada a 37 °C durante 30 minutos seguido por arrefecimento a 4° C.

A digestão da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC por *Dra* III é verificada por amplificação por PCR. Os produtos de amplificação não serão utilizados para clonagem de fragmentos de anticorpo. A amplificação positiva da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC digerida é observada em reacções utilizando o 5' VBVH1a e o iniciador de controlo interno 3'CM0 sob duas diferentes condições de tampão. Boa amplificação com iniciadores 5' VBVH1a/3'CM0 e amplificação

mínima com iniciadores 5'VBVH1a/3'CM1 indicam digestão bem sucedida da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc molde com *Dra* III.

Amplificação Linear da 2<sup>a</sup> Cadeia Pesada e Extensão de Oligo Interno

A 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc digerida com *Dra* III é utilizada como o molde original para estabelecer reacções múltiplas de 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc utilizando um iniciador específico da estrutura 1 (0,4 uM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção 10X (Applied Biosystems). Os iniciadores são concebidos para conter a sequência TMX24, um sítio de restrição *Xho* I, e uma região que emparelha com a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc na região da estrutura 1 dos genes de cadeia pesada de anticorpo humano. Estas sequências de emparelhamento são derivadas dos iniciadores da base de dados VBase que são concebidos com base nas sequências conhecidas de anticorpos humanos e são reportados para cobrir todo o repertório de genes da cadeia pesada de anticorpo humano como descrito acima no exemplo 3. Os iniciadores específicos da estrutura 1 da cadeia pesada utilizada são os listados no exemplo 3.

As amostras são desnaturadas por calor a 94 °C durante 1 minuto, depois submetida a ciclos 20 vezes a 94 °C durante 5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc. Um oligo interno nucleótido designado "TMX24CMnpt" (como utilizado no Exemplo 3) é adicionado em gelo para uma concentração final de 0,2 uM. A 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc são depois alongadas para além do oligo interno por desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 1 minuto, emparelhamento e alongamento a 68 °C durante

2 minutos, seguido por 4 °C. A 2<sup>a</sup> cadeia de ADNC resultante (molde manipulado) é depois purificada utilizando uma coluna de centrifugação QIAGEN (PCR Purification Kit). Este passo removeu os oligonucleótidos livres e permitiu uma troca de tampão simples para protocolos subsequentes.

#### Amplificação com Iniciador Único (SPA) da Cadeia Pesada

O molde manipulado é amplificado utilizando Advantage 2 polimerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção 10X, dNTP, e iniciador "TMX24". As amostras são desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto, depois submetidas a 30 ciclos de 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto é seguido por 3 minutos adicionais a 68 °C e manutenção 4 °C.

#### Clonagem da Cadeia Pesada & Produção da Biblioteca

Os produtos de amplificação de aproximadamente 500 pb são purificados em gel e depois digeridos com *Xho* I e *EcoR* I. As inserções são clonadas num vector apropriado contém a restante porção do domínio CH1 de IgM. O produto ligado contendo uma biblioteca de Fab é introduzido em *E. coli* por electroporação.

De modo a produzir a biblioteca de Fab na superfície de bacteriófagos, é utilizada uma estirpe supressora de células tal como XL1BLUE (Stratagene). Após electroporação, as células são agitadas durante 1 hora a 37° depois é adicionada carbenicilina a 20 µg/mL. Após uma hora de agitação a 37 °C a carbenicilina é aumentada para 50 µg/mL por mais uma hora a 37 °C. O fago auxiliar VCS-M13 (Stratagene) é depois adicionado para

proporcionar todos os componentes necessários para produção de partículas de fagemídeo e o volume da cultura é aumentado para 100 mL de meio SB. Após uma hora a 37 °C é adicionada canamicina para 70 µg/mL para seleccionar as bactérias contendo ADN do fago auxiliar. A cultura é agitada a 37° de um dia para o outro. Durante esse tempo a bactéria produz novas partículas de fagemídeo que possuem Fab exposto à sua superfície. Na manhã seguinte as partículas de fagemídeo podem ser isoladas por centrifugação das células bacterianas e depois precipitação das partículas de fagemídeo a partir do sobrenadante com 4% de PEG 8000 e 0,5 M de NaCl em gelo durante 30 minutos. O sedimento de fagos precipitados na centrifugação a 14 300 Xg. O sedimento pode ser ressuspensão em PBS/1% de BSA. A preparação pode ser filtrada para remover os resíduos bacterianos. A biblioteca resultante é armazenada a 4 °C.

#### **EXEMPLO 5**

Construção de uma biblioteca de exposição em fagemídeo de ARNm de murganhos imunizados com IgE ou uma IgE Fc CH2-4 recombinante.

#### Síntese e modificação da 1<sup>a</sup> Cadeia de ADNc para as Cadeias Pesada de IgG e Leve Kapa

O ARNm de baço de murganho de murganhos imunizados com IgE humana ou IgE humana recombinante foi utilizado para produzir a tradicional 1<sup>a</sup>cadeia de ADNc com um iniciador oligo dT. Isto foi efectuado utilizando SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) essencialmente de acordo

com as instruções do kit. O oligonucleótido de restrição "mCG1Xcm I" para IgGI, "mCG2aBsaJ I" para IgG2a ou "mCKHpa I" para a cadeia leve kapa foi adicionada à primeira cadeia de ADNc de modo a produzir uma região de cadeia dupla de ADN que pode ser digerida pela endonuclease de restrição Xcm I para IgGI, BsaJ I para IgG2a ou Hpa I para a cadeia leve kapa. A sequência "mCG1Xcm I" é 5'CTAACTCCAT GGTGACCCCTGGGATG3' (Seq. ID N° 200). A sequência "mCG2aBsaJ I" é 5'CAACTGGCTCCTCGGT GACTCTAG3' (Seq. ID N° 201), a sequência "mCKHpa I" é 5'CAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGG3' (Seq. N° 202). A reacção foi estabelecida com a 1ª cadeia de ADNc, 1 uM de oligonucleótido e quantidade apropriada de tampão NEB 10x (New England Biolab) ou tampão de restrição A 10X (Roche Diagnostics). A amostra foi aquecida a 95 °C durante 2 minutos e depois mantida a 64 °C durante dois minutos, para permitir que ocorra emparelhamento específico, e arrefecida a 37 °C para Xcm I e Hpa I e 60 °C para BsaJ I. A endonuclease de restrição Xcm I, BsaJ I, ou Hpa I (New England Biolabs) foi adicionada e incubada a 37 °C durante 30 minutos, 60 °C durante 30 min e 37 °C durante 10 minutos, respectivamente. A enzima de restrição foi inactivada por calor para Xcm I a 65 °C durante 20 minutos e para BsaJ I a 80 °C durante 20 min e depois a amostra foi arrefecida a 4 °C.

A digestão da 1ª cadeia de ADNc por cada endonuclease de restrição foi verificada por amplificação por PCR utilizando técnicas conhecidas dos especialistas na técnica. Estes produtos não foram utilizados para clonagem dos genes de anticorpo. A amplificação positiva da 1ª cadeia de ADNc digerida foi observada em reacções utilizando o 5'TMX24mVHIIIBshort e o iniciador de controlo interno 3' mCG1 para IgGI, 5'TMX24mVHIIIBshort e o iniciador de controlo interno 3'mCG2a para IgG2a e 5'TMX24mVKIVshort e o iniciador de controlo interno

3' mCK0 ou kapa. Boa amplificação com os iniciadores 5' TMX24mVHII Bshort/3' mCG1 ou os iniciadores 5' TMX24mVHII Bshort/3' mCG2a ou 5' TMX24mVKIVshort/3' mCK0 e amplificação mínima com os iniciadores 5' TMX24mVHII Bshort/3' mCG1B ou 5' TMX24mVHII Bshort/3' mCG2aB ou 5' TMX24mVKIVshort/3' mCKB indica digestão bem sucedida da 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC molde com cada endonuclease de restrição. As sequências dos iniciadores utilizados para verificar o PCR foram

**TMX24mVHII Bshort (Seq. ID Nº 203)**

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTCCAAGTGCAGCAGYC3'

**mCG1 (Seq. ID Nº 204)** 5'CATGGAGTTAGTTGGGCAGCAG3'

**mCG1B (Seq. ID Nº 205)** 5'CAACGTTGCAGGTGACGGTCTC3'

**mCG2a (Seq. ID Nº 206)** 5'CGAGGAGCCAGTTGTATCTCCAC3'

**mCG2aB (Seq. ID Nº 207)** 5'CCACATTGCAGGTGATGGACTG3'

**TMX24mVKIVshort (Seq. ID Nº 208)**

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAWTGTGCTACCCAGTC  
TC3'

**mCK0 (Seq. ID Nº 209)** 5'CTGCTCACTGGATGGTGGGAAG3'

**mCKB (Seq. ID Nº 210)** 5'GAGTGGCCTCACAGGTATAGCTG3'

Amplificação Linear da 2<sup>a</sup> Cadeia da Cadeia Leve e Extensão  
com Oligo Interno

A 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC digerida com *Hpa* I foi utilizada como o molde original para estabelecer reacções múltiplas de 2<sup>a</sup> cadeia de ADNC utilizando um iniciador específico da estrutura 1

(0,4 uM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção 10X (Applied Biosystems). Os iniciadores foram concebidos para conter a sequência TMX24mK para kapa e o sítio de restrição *Xba* I, e uma região que emparelha com a 1<sup>a</sup> cadeia de ADNC da região da estrutura 1 dos genes da cadeia leve kapa de anticorpo de murganho. Essas sequências de emparelhamento foram concebidas com base nas sequências conhecidas de anticorpos de murganho derivadas da base de dados Kabat (<http://immunobme.nwu.edu/>) para cobrir todo o repertório de genes da cadeia leve kapa de anticorpo de murganho.

#### **D. Iniciadores específicos da Estrutura 1 de Kapa:**

TMX24mVKIshort (Seq. ID Nº 211) *Xba* I

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTGATGWCACAGTCTC3'

TMX24mVKIIashort (Seq. ID Nº 212)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATGTTKTGATGACCCARACTC3'

TMX24mVKIIbshort (Seq. ID Nº 213)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTGATGACKCAGGCTG3'

TMX24mVKIIIfshort (Seq. ID Nº 214)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACAWTGTGCTGACCCARTCTC3'

TMX24mVKIVshort (Seq. ID Nº 215)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAWTGTGCTCACCCAGTCTC3'

TMX24mVKVashort (Seq. ID Nº 216)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATCCAGATGACMCAGTCTC3'

TMX24mVKVbshort (Seq. ID Nº 217)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATATCCAGATGACACAGACTAC3'

TMX24mVKVcshort (Seq. ID Nº 218)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTSATGACCCAGTC3'

TMX24mVKVIshort (Seq. ID Nº 219)

5 'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTC3'

Em que (R é uma mistura igual de A e G, M é uma mistura igual de A e C, K é uma mistura igual de G e T, W é uma mistura igual de A e T, e S é uma mistura igual de C e G).

As amostras foram desnaturadas por calor a 94 °C durante 1 minuto, depois submetidas a ciclos 20 vezes a 94 °C durante 5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc. Um oligo interno designado "TMX24mCKnoer" para cadeias kapa foi adicionado em gelo para uma concentração final de 0,2 uM. A sequência de "TM24CKnpt" foi 5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCCG GATGTTAACTGCTCACTGGATGGTGGGAAGATGG2'OMe [A(ps)U(ps)U(ps)](propil)3' (Seq. ID Nº 220). As 2<sup>a</sup>s cadeias de ADNc foram depois alongadas para além do oligo interno por desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 1 minuto, emparelhamento e alongamento a 68 °C durante 2 minutos, seguido por 4 °C. A 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc resultante (molde manipulado) foi purificada utilizando uma coluna de centrifugação QIAGEN (PCR Purification Kit). Este passo remove os oligonucleótidos livres e permite a troca de tampão simples para protocolos subsequentes.

#### Amplificação com Iniciador Único (SPA) da Cadeia Leve

O molde manipulado foi amplificado utilizando Advantage 2 polymerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção 10X, dNTP, e iniciador "TMX24mK" para as cadeias kapa. A sequência para "TMX24mK" é 5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTG3' (Seq. ID Nº 221). As amostras foram desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto depois submetidas a ciclos 25 vezes a 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto seguido por mais 3 minutos a 68° C e uma espera de 4 °C.

### Clonagem de Cadeia Leve

Os produtos de amplificação kapa foram purificados em gel e depois digeridos com *Xba* I e *BspE* I. As inserções foram clonadas num vector de expressão adequado que contém a restante porção da região constante da cadeia leve kapa. O produto ligado foi introduzido em *E. coli* por electroporação e cultivado de um dia para o outro a 37 °C. Na manhã seguinte foi efectuada uma maxiprep de ADN para recuperar o ADN da biblioteca de ADN de cadeia leve. O ADN da biblioteca de cadeia leve foi utilizado nos passos subsequentes para clonagem na cadeia pesada de fragmentos Fd em *Xho* I/*Bln* I para completar a construção da biblioteca como descrito a seguir na Clonagem da Cadeia Pesada.

### Amplificação Linear da 2ª Cadeia da Cadeia Pesada e Extensão de Oligo Interno

As 1ªs cadeias de ADNc digeridas com *Xcm* I e *BsaJ* I foram utilizadas para estabelecer reacções múltiplas de 2ª cadeia de ADNc utilizando o iniciador específico da estrutura 1 (0,4 uM final), dNTP, enzima AmpliTaq e o seu tampão de reacção 10X (Applied Biosystems). Os iniciadores foram concebidos para conter a sequência TMX24mH, um sítio de restrição *Xho* I, e uma região que emparelha com a 1ª cadeia de ADNc na região da estrutura 1 dos genes de cadeia de anticorpo de murganho. Estas sequências emparelhadas foram concebidas com base nas sequências conhecidas de anticorpos de murganho derivadas da base de dados Kabat (<http://immunobme.nwu.edu/>) para cobrir todo o repertório de genes de cadeia pesada de anticorpo de murganho.

**Iniciadores Específicos da Estrutura 1 da Cadeia Pesada:**

TMX24mVHIAshorter (Seq. ID Nº 222) Xho I

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGCAGCTTCAGSAGTC3 '

TMX24mVHIBshorter (Seq. ID Nº 223)

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGCAGCTGAAGSAGTC3 '

TMX24mVHIIAshorter (Seq. ID Nº 224)

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTYCAGCTGCARCARC3 '

TMX24mVHIIIBshorter (Seq. ID Nº 225)

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTCCAAGTGCAGCAGYC3 '

TMX24mVHIIICshorter (Seq. ID Nº 226)

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTCAACTGCAGCAGTC3 '

TMX24mVHIIIAshorter (Seq. ID Nº 227)

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGAAGCTGGTGGAGWC3 '

TMX24mVHIIIBshorter (Seq. ID Nº 228)

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGAAGCTTCTGGAGTC3 '

TMX24mVHIIIDshorter (Seq. ID Nº 229)

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGMAGCTGGTGGAGTC3 '

Em que (R é uma mistura igual de A e G, M é uma mistura igual de A e C, Y é uma mistura igual de C e T, e S é uma mistura igual de C e G).

As amostras foram desnaturadas por calor a 94 °C durante 1 minuto, depois submetida a ciclos 20 vezes de 94 °C durante 5 segundos, 56 °C durante 10 segundos e 68 °C durante 2 minutos. Isto permitiu a amplificação linear da 2ª cadeia de ADNc. Um oligo interno designado "TMX24mCG1noer" para IgGI e "TMX24mCG2anoer" para IgG2a foram adicionados em gelo para uma concentração final de 0,2 uM. A sequência de "TMX24mCG1noer" foi 5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTAGGGTTACCATGGAGTTAGTTGGGCAGCAGA2'0

Me [U(ps)C(ps)A(ps)] (propil) 3' (Seq. ID N° 230) e  
"TMX24mCG2anoer" foi  
5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCCTAGGGTCATCGAGGAGCCAGTTGTA  
TCTCCACA2'OMe [C(ps)A(ps)U(ps)] (propil) 3' (Seq. ID N° 231).

A 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc foi depois alongada além do oligo interno por desnaturação por aquecimento a 94 °C durante 1 minuto, emparelhamento e alongamento a 68 °C durante 2 minutos, seguido por 4 °C. A 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc resultante (molde manipulado) foi purificada utilizando uma coluna de centrifugação QIAGEN (PCR Purification Kit). Este passo remove os oligonucleótidos livres e permite uma troca de tampão simples para os protocolos subsequentes.

#### Amplificação com Iniciador Único (SPA) da Cadeia Pesada

O molde manipulado foi amplificado utilizando Advantage 2 polymerase mix (Clontech) e o seu tampão de reacção 10X, dNTP, e o iniciador "TMX24mH" para cadeias pesadas. A sequência para "TMX24mH" é 5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTG 3' (Seq. ID N° 232). As amostras foram desnaturadas por calor a 95 °C durante 1 minuto depois submetidas a ciclos 28 vezes para IgG1 e 30 vezes para IgG2a através de 95 °C durante 5 segundos e 68 °C durante 1 minuto. Isto foi seguido por mais 3 minutos a 68 °C e uma espera a 4 °C.

#### Clonagem da Cadeia Pesada

Os produtos de amplificação da cadeia pesada foram purificados em gel e depois digeridos com *Xho* I e *Bln* I. as

inserções foram clonadas em ADNs de bibliotecas de cadeia kapa que contêm a restante porção da região constante da cadeia pesada para IgG1 e IgG2a. O produto ligado foi introduzido em *E. coli* por electroporação e cultivado de um dia para o outro a 37° C. na manhã seguinte foi preparada uma maxiprep de ADN para recuperar o ADN da biblioteca de ADN de IgG1 kapa ou IgG2a kapa.

Seleção e Pesquisa de Bibliotecas em IgE Fc CH2-4 recombinante

As bibliotecas seleccionadas com IgE Fc CH2-4 recombinante durante 4 rondas essencialmente como descrito em Barbas III, CF Burton, DR, Scott, JK e Silverman, GJ (2001) Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque. Os clones individuais das 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> rondas de selecção foram pesquisadas por ELISA em IgE Fc CH2-4 recombinante.

Os clones que apresentaram ligação específica a IgE IgE Fc CH2-4 e ligação mínima a proteína não específica, ovalbumina por ELISA foram analisados por sequenciação de ADN. Foram isolados um total de 31 Fab distintos contra IgE Fc CH2-4 a partir de bibliotecas de murganho. Ver Figs. 9a-d.

Deverá ser entendido que podem ser feitas várias modificações às formas de realização aqui descritas. Deste modo, a descrição acima não deve ser interpretada como limitante, mas meramente como exemplificações das formas de realização preferidas.

Lisboa, 7 de Dezembro de 2009

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método de amplificação de ácido nucleico compreendendo:
  - a) emparelhamento de um iniciador com um molde, possuindo o iniciador uma primeira porção que emparelha com o molde e uma segunda porção de sequência pré-determinada que não emparelha com o molde;
  - b) síntese de um polinucleótido que é complementar à porção do molde entre a localização na qual a primeira porção do iniciador emparelha com o molde e a extremidade do molde, possuindo o polinucleótido o iniciador numa sua primeira extremidade e uma segunda extremidade;
  - c) separação do o polinucleótido sintetizado no passo (b) do molde;
  - d) emparelhamento de um oligonucleótido molde com a segunda extremidade do polinucleótido sintetizado no passo (b), possuindo o oligonucleótido molde uma primeira porção que emparelha com a segunda extremidade do polinucleótido e uma segunda porção possuindo a mesma sequência pré-determinada da segunda porção do iniciador;
  - e) extensão do polinucleótido sintetizado no passo (b) para proporcionar uma sua porção terminal que é complementar à sequência pré-determinada, em que o referido oligonucleótido molde não é estendido na sua extremidade 3'; e

- f) amplificação do polinucleótido estendido utilizando um iniciador único possuindo a sequência pré-determinada.
2. Método como na reivindicação 1, em que o passo de emparelhamento com um oligonucleótido molde compreende proporcionar uma colecção de oligonucleótidos molde possuindo diferentes sequências e colocando em contacto a colecção de oligonucleótidos molde com o polinucleótido sintetizado no passo (b).
3. Método como na reivindicação 1, em que o molde é digerido antes do emparelhamento com o iniciador.
4. Método como na reivindicação 1 em que o polinucleótido sintetizado no passo (b) é digerido antes do emparelhamento com o oligonucleótido molde.
5. Método de amplificação de ácido nucleico compreendendo:
- a) emparelhamento de um iniciador e de um oligonucleótido de fronteira com um molde, possuindo o iniciador uma primeira porção que emparelha com o molde e uma segunda porção da sequência pré-determinada que não emparelha com o molde, em que o oligonucleótido de fronteira se liga ao molde numa posição a jusante da extremidade 3' do iniciador e terminará a extensão do iniciador ao longo do molde na posição em que a extremidade 5' do oligonucleótido de fronteira se liga;
- b) síntese do polinucleótido que é complementar à porção do molde entre a localização na qual a primeira porção do iniciador emparelha com o molde e a porção do molde com que

- o oligonucleótido de fronteira emparelha, possuindo o polinucleótido o iniciador numa primeira extremidade deste e uma segunda extremidade;
  - c) separação do polinucleótido sintetizado no passo (b) do molde;
  - d) emparelhamento de um oligonucleótido molde com a segunda extremidade do polinucleótido sintetizado no passo (b), possuindo o oligonucleótido molde uma primeira porção que emparelha com a segunda extremidade do polinucleótido e uma segunda porção possuindo a mesma sequência pré-determinada da segunda porção do iniciador;
  - e) extensão do polinucleótido sintetizado no passo (b) para proporcionar uma porção sua terminal que é complementar à sequência pré-predeterminada em que o referido oligonucleótido molde não é estendido na sua extremidade 3'; e
  - f) amplificar o polinucleótido estendido utilizando um iniciador único possuindo a sequência pré-determinada.
6. Método como na reivindicação 5, em que o passo de emparelhamento com um oligonucleótido molde comprehende proporcionar uma colecção de oligonucleótidos molde possuindo diferentes sequências e colocando em contacto a colecção de oligonucleótidos molde com o polinucleótido sintetizado no passo (b).
7. Método para produzir uma biblioteca de anticorpos comprehendendo:

- a) proporcionar uma população diversa de moldes;
- b) colocar em contacto a população diversa de moldes com, pelo menos, um iniciador, possuindo o, pelo menos um, iniciador uma primeira porção que emparelha com os moldes e uma segunda porção de sequência pré-determinada que não emparelha com os moldes;
- c) síntese de polinucleótidos que são complementares à porção dos moldes entre a localização em que a primeira porção do iniciador emparelha com o molde e a extremidade dos moldes, possuindo os polinucleótidos o iniciador numa sua primeira extremidade e uma segunda extremidade;
- d) separação dos polinucleótidos sintetizados no passo (c) dos moldes;
- e) emparelhamento de, pelo menos, um oligonucleótido molde com a segunda extremidade dos polinucleótidos sintetizados no passo (c), possuindo o, pelo menos um, oligonucleótido molde uma primeira porção que emparelha com a segunda extremidade dos polinucleótidos e uma segunda porção possuindo a mesma sequência pré-determinada da segunda porção do iniciador;
- f) extensão dos polinucleótidos sintetizados no passo (c) para proporcionar uma sua porção terminal que é complementar á sequência pré-determinada, em que o referido, pelo menos um, oligonucleótido molde não é estendido na sua extremidade 3'; e

- g) amplificação dos polinucleótidos estendidos utilizando um iniciador único possuindo a sequência pré-determinada.
8. Método da reivindicação 1 ou reivindicação 5, em que a extremidade 3' do referido oligonucleótido molde não hibrida com o polinucleótido sintetizado no passo (b).
9. Método da reivindicação 1 ou reivindicação 5, em que a extremidade 3' do referido oligonucleótido molde compreende bases modificadas que evitam a extensão na extremidade 3' do referido oligonucleótido molde.
10. Método da reivindicação 5, em que a extremidade 3' do referido de oligonucleótido de fronteira não hibrida com o molde.
11. Método da reivindicação 5, em que o oligonucleótido de fronteira compreende o ácido nucleico bloqueado que evita a extensão na extremidade 3' do referido oligonucleótido de fronteira.
12. Método da reivindicação 7, em que a extremidade 3' do referido, pelo menos um, oligonucleótido molde não hibrida com o polinucleótido sintetizado no passo (c).
13. Método da reivindicação 7, em que a extremidade 3' do referido, pelo menos um, oligonucleótido molde compreende bases modificadas que evitam a extensão na extremidade 3' do referido oligonucleótido molde.

Lisboa, 7 de Dezembro de 2009

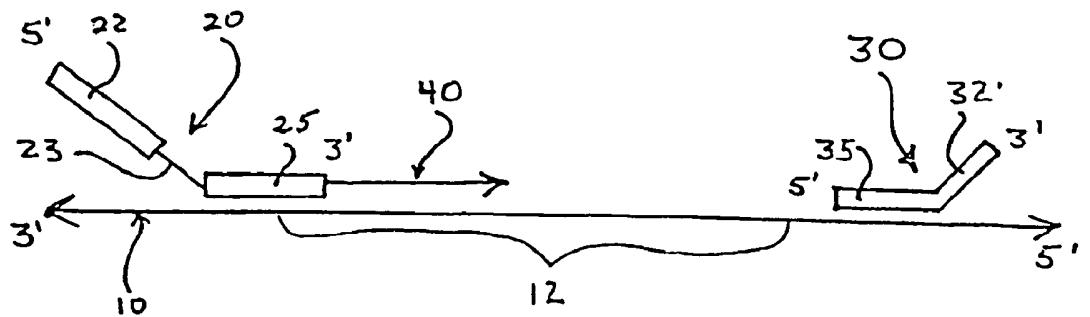


Fig. 1

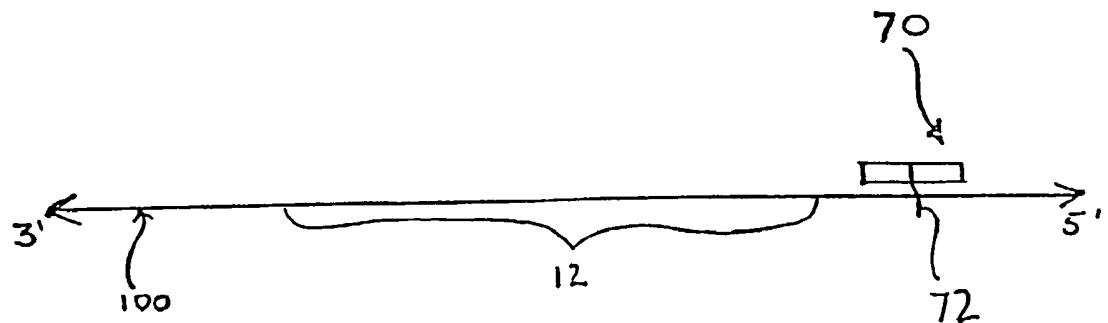


Fig. 2A

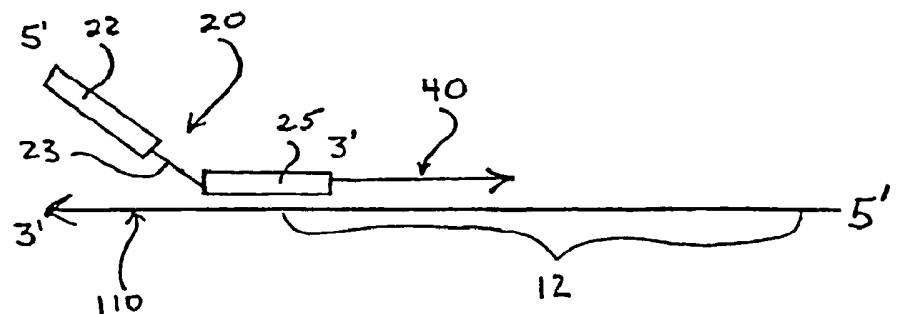
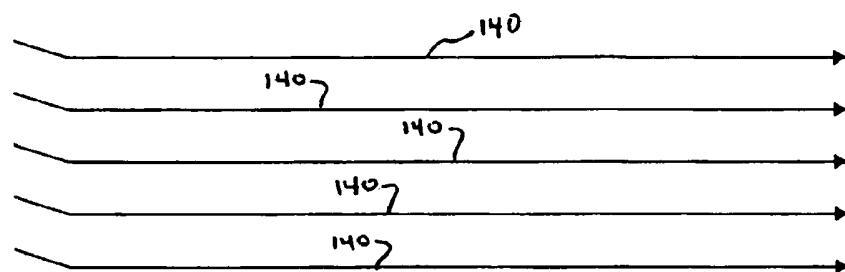
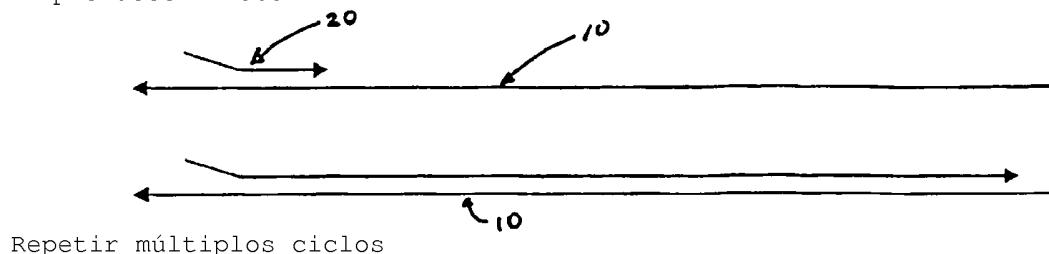


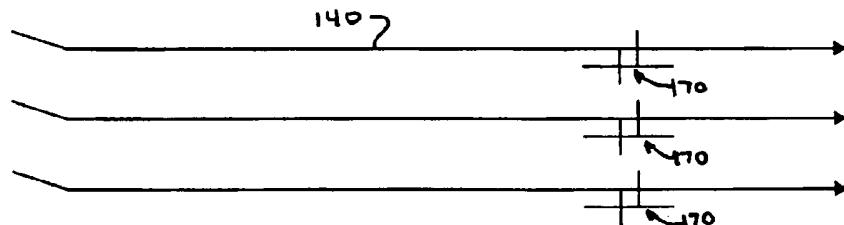
Fig. 2B

### Fig. 3

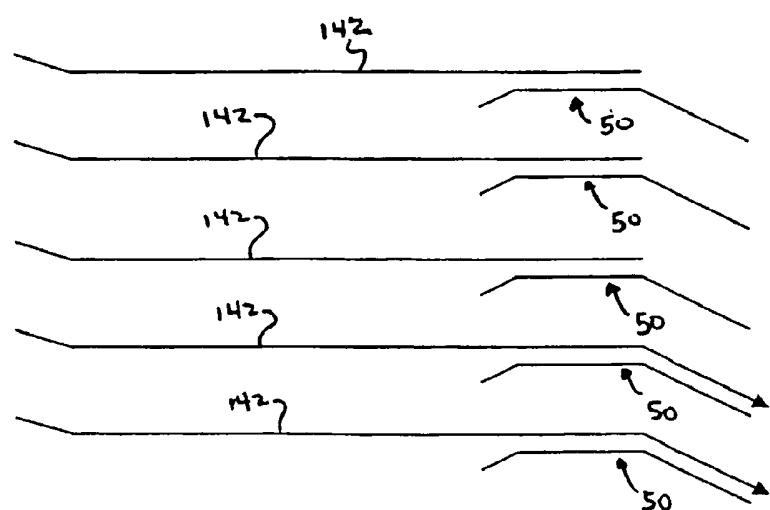
A síntese da 2<sup>a</sup> cadeia de ADNc na 1<sup>a</sup> cadeia de ADNc através de um iniciador que possui uma primeira porção que hibrida com a região variável de um gene de anticorpo e uma segunda porção com uma sequência pré-determinada



Hibridar um oligonucleótido de restrição na posição desejada na região constante de gene de anticorpo e digerir com uma enzima de restrição apropriada (RED)



Desnaturar pelo calor e adicionar o oligonucleótido interno e efectuar a reacção de extensão do oligonucleótido interno (NOER)



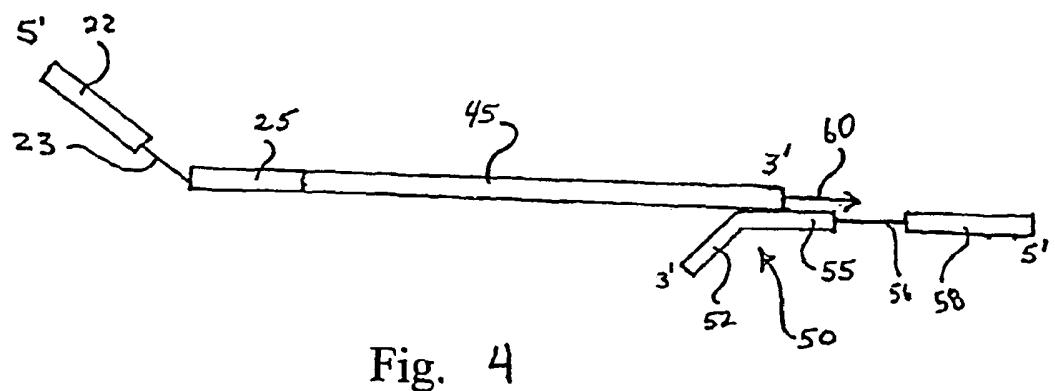


Fig. 4

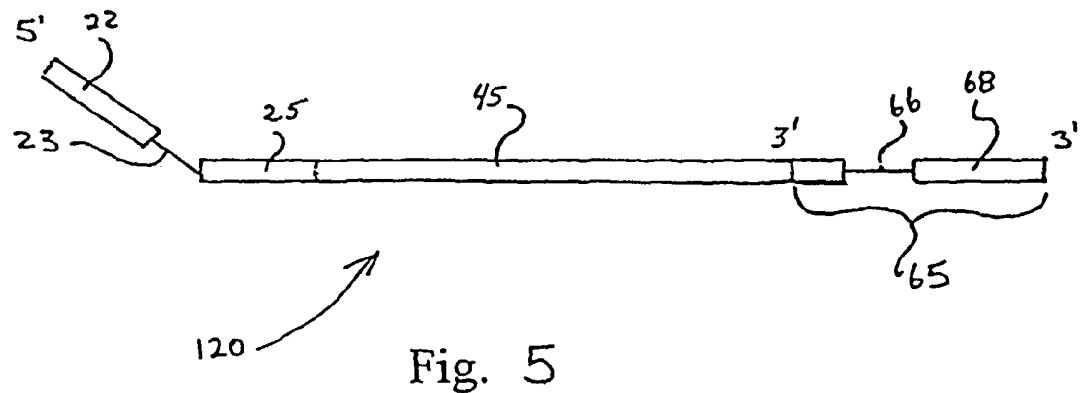
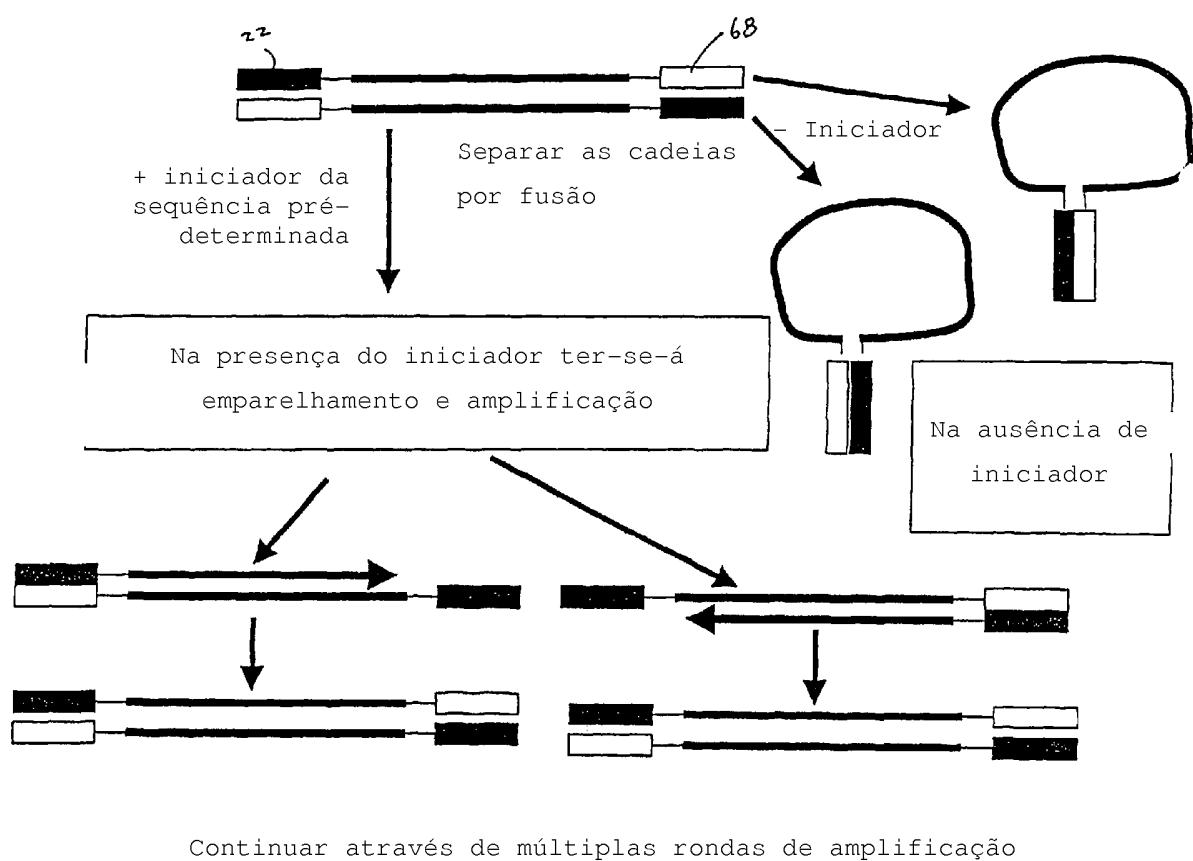


Fig. 5

**Figura 6** Amplificação com iniciador único



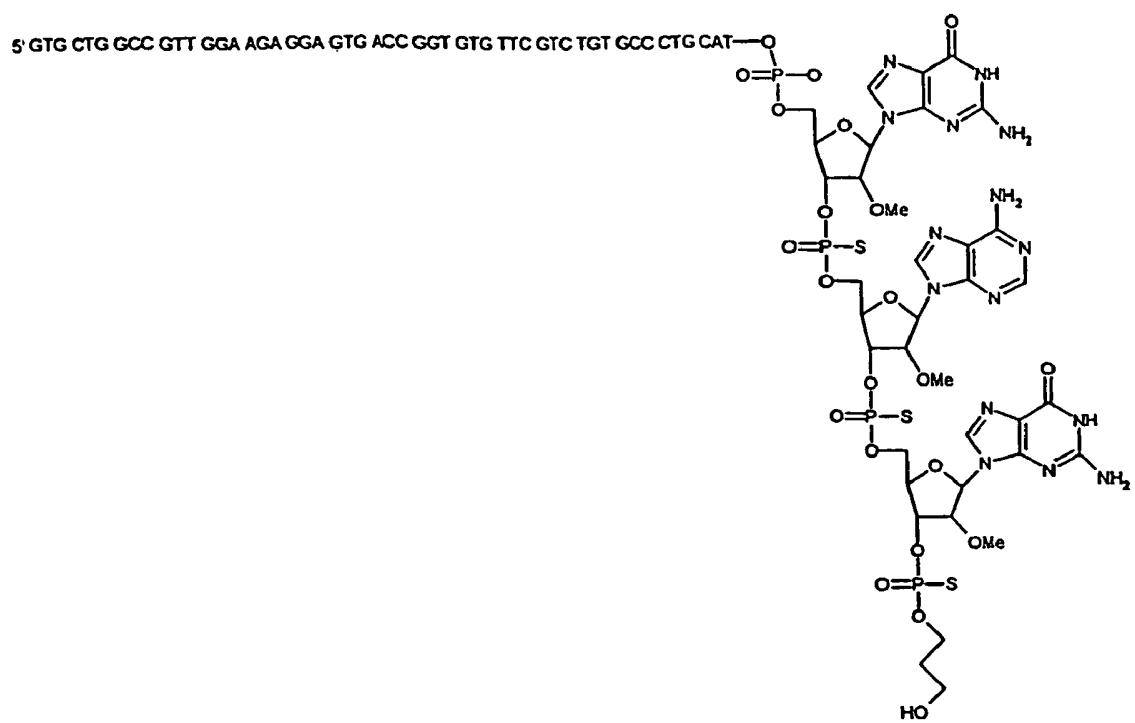


Fig. 7

## Clones de kapa de IgG

### Cadeia Pesada

Fab	Estrutura 1	CDR1	Estrutura 2	CDR2
HBPAK1a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG	S--YTMN	WVRQAPGKLEWIS YIST--TSSSIYVADSVKG	VH3
HBPAK1b	Q***L***V***T***T***	-----	-----	VH3
HBPAK1c	Q***	-----	-----	VH3
HBPAK1d	***L***	-----	-----	VH3
HBPAK2a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG	S--SANS	WVRQAPGKLEWIS YISG--NGFSTTYADSVKG	VH3
HBPAK2b	-----	-----	-----	VH3
HBPAK2c	-----	-----	-----	VH3
HBPAK2d	-----	-----	-----	VH3
HBPAK2e	-----	-----	-----	VH3
HBPAK2f	-----	-----	-----	VH3
HBPAK3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--SANS	WVRQAPGKLEWIS YISG--NGFSTTYADSVKG	VH3
HBPAK3b	-----	-----	-----	VH3
HBPAK3c	-----	-----	-----	VH3
HBPAK3d	-----	-----	-----	VH3
HBPAK3e	-----	-----	-----	VH3
HBPAK3f	-----	-----	-----	VH3
HBPAK4a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YGCIC	WVRQAPGQGLEWMS WIST--YNGNTNTAQKLOG	VH1
HBPAK4b	-----	-----	-----	VH1
HBPAK4c	-----	-----	-----	VH1
HBPAK4d	-----	-----	-----	VH1
HBPAK4e	-----	-----	-----	VH1
HBPAK4f	-----	-----	-----	VH1
HBPAK5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YGCIC	WVRQAPGQGLEWMS WIST--YNGNTNTAQKLOG	VH1
HBPAK6a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	WVRQAPGQGLEWMS	WIST--YNGNTNTAQKLOG	VH1
HBPAK6b	-----	-----	-----	VH1
HBPAK7a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SLIMYFWG	WIRQPPGKLEWIG SIZ--YSGTAYYNEPLRS	VH3
HBPAK7b	-----	-----	-----	VH3
HBPAK7c	-----	-----	-----	VH4
HBPAK7d	-----	-----	-----	VH4
HBPAK7e	-----	-----	-----	VH4
HBPAK8a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	R--YTLS	WVRQAPGKLEWIS YIST--DGSTIYVADSVKG	VH3
HBPAK8b	-----	-----	-----	VH3
HBPAK9a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	R--YTLS	WVRQAPGKLEWIS YIST--DGSTIYVADSVKG	VH3
HBPAK9b	-----	-----	-----	VH3
HBPAK10a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	R--YTLS	WVRQAPGKLEWIS YIST--DGSTIYVADSVKG	VH3
HBPAK11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	D--YAMH	WVRQAPGKLEWIS YIST--DGSTIYVADSVKG	VH3

Fab	Estrutura 3	DH	JH	CDR3
HBPAK1a	RFSISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFVEGS-----	YWSFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 83)
HBPAK1b	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 84)
HBPAK1c	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 85)
HBPAK1d	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 86)
HBPAK2a	RFSISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFVEGS-----	YWSFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 87)
HBPAK2b	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 88)
HBPAK2c	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 89)
HBPAK2d	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 90)
HBPAK2e	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 91)
HBPAK3a	RFSISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFVEGS-----	YWSFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 92)
HBPAK3b	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 93)
HBPAK4a	RFSISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFVEGS-----	YWSFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 94)
HBPAK4b	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 95)
HBPAK5	RVTMIDTISTSTAYMELRSRLSDDATVYVYCAR	AWPPFRGSQQLDR---	GOYFCHWGGCTLVTVSS	JH1 (Seq. ID N° 96)
HBPAK6a	RFSISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFVEGS-----	YWSFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 97)
HBPAK7a	RATISVDTISKNOLSLKLMSVTAADATVYVYCAR	PSSTYFNGRSTYPCET	APFIMCGQTTVAVSS	JH3 (Seq. ID N° 98)
HBPAK7b	-----	-----	-----	JH3 (Seq. ID N° 99)
HBPAK7c	-----	-----	-----	JH3 (Seq. ID N° 100)
HBPAK7d	-----	-----	-----	JH3 (Seq. ID N° 101)
HBPAK7e	-----	-----	-----	JH3 (Seq. ID N° 102)
HBPAK8a	RFSISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFVEGS-----	YWSFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 103)
HBPAK9a	RFTISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFGEFNRA-----	WYVFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 104)
HBPAK9b	-----	-----	-----	JH2 (Seq. ID N° 105)
HBPAK10a	RFSISRDNAKNSLYLQMNLRLDEDATVYVYCAR	VVFVEGS-----	YWSFDLWGRGTLVTVSS	JH2 (Seq. ID N° 106)
HBPAK11	RFTTSRDNAKNSLYLQMDSLTPEDATVYVYCAR	DQGGRFRL-----	VDYWGQGTIVTVSS	JH4 (Seq. ID N° 107)

Fig 8a

## Cadeia leve

Fig 8b

Fab	Estrutura 3	JK	CDR3		
			Seq.	ID N°	
HBPAKX1a	3A1	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFVYVYC	QOYNNWPP--ITFGQGTRLEIR	JK5 (Seq. ID N° 108)	
HBPAKX1b	3A2	-----A-----	-----K	JK5 (Seq. ID N° 109)	
HBPAKX1c	3A3	-----dy--S-----A-----	-----TY--G-----P-----VDF	JK3 (Seq. ID N° 110)	
HBPAKX1c	3A8	-----A-----	-----DK-----L-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 111)	
HBPAKX1c	3G6	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 112)	
HBPAKX1d	3C11	-----A-----	-----F-----P-----DK-----N-----K	JK2 (Seq. ID N° 113)	
HBPAKX1d	3F4	-----A-----	-----F-----P-----K-----P-----N-----K	JK2 (Seq. ID N° 114)	
HBPAKX2a	3A1	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 115)	
HBPAKX2a	3A5	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 116)	
HBPAKX2a	3A6	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 117)	
HBPAKX2a	3A9	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 118)	
HBPAKX2a	3B5	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 119)	
HBPAKX2a	3B7	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 120)	
HBPAKX2a	3B9	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 121)	
HBPAKX2a	3C1	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 122)	
HBPAKX2a	3C4	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 123)	
HBPAKX2a	3C6	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 124)	
HBPAKX2a	3C8	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 125)	
HBPAKX2a	3C9	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 126)	
HBPAKX2a	3D4	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 127)	
HBPAKX3a	3B1	-----A-----	-----F-----P-----K-----P-----N-----K	JK2 (Seq. ID N° 128)	
HBPAKX3b	3C6	-----T-----A-----	-----P-----K-----P-----N-----K	JK5 (Seq. ID N° 129)	
HBPAKX4a	3B9	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 130)	
HBPAKX4b	3B2	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	JK4 (Seq. ID N° 131)	
HBPAKX5	3B5	-----A-----	-----T-----K-----V-----K	JK1 (Seq. ID N° 132)	
HBPAKX6	3C9	-----A-----	-----T-----K-----V-----K	JK4 (Seq. ID N° 133)	
HBPAKX7a	3D1	-----R-----EP-----A-----	-----H-----G-----S-----G-----V-----	-----DVK	JK5 (Seq. ID N° 134)
HBPAKX7b	3D3	-----D-----R-----EP-----A-----	-----G-----S-----P-----I-----	-----K-----K	JK5 (Seq. ID N° 135)
HBPAKX7b	3F5	-----D-----R-----EP-----A-----	-----G-----S-----P-----K-----F-----K	JK3 (Seq. ID N° 136)	
HBPAKX7c	3D7	-----A-----D-----R-----EP-----A-----	-----G-----R-----P-----G-----K-----V-----K	-----K-----JK4 (Seq. ID N° 137)	
HBPAKX7d	3B1	-----V-----D-----A-----A-----V-----A-----	-----Y-----T-----L-----G-----K-----V-----K	-----K-----JK4 (Seq. ID N° 138)	
HBPAKX7e	3E8	-----DF-----Q-----G-----S-----A-----	-----H-----D-----Q-----G-----K-----V-----F-----K	-----K-----JK1 (Seq. ID N° 139)	
HBPAKX8a	3C9	-----A-----	-----K-----V-----G-----KV-----	-----K-----JK4 (Seq. ID N° 140)	
HBPAKX9a	3E3	-----V-----D-----EP-----A-----	-----R-----S-----N-----G-----K-----V-----K	-----K-----JK4 (Seq. ID N° 141)	
HBPAKX9b	3E7	-----D-----EP-----A-----	-----R-----S-----P-----G-----K-----V-----K	-----K-----JK4 (Seq. ID N° 142)	
HBPAKX9b	3G5	-----D-----EP-----A-----	-----R-----S-----P-----G-----K-----V-----K	-----K-----JK5 (Seq. ID N° 143)	
HBPAKX10	3F10	-----D-----EP-----A-----	-----R-----S-----P-----L-----E-----K-----P-----N-----K	-----K-----JK4 (Seq. ID N° 144)	
HBPAKX11	3G8	-----V-----S-----	-----D-----P-----A-----T-----H-----Y-----L-----G-----K-----V-----K	-----K-----JK4 (Seq. ID N° 145)	

Fig 8c

## Clones de Lambda de IgG

## Cadeia Pesada

Fab		Estrutura 1	CDR1	Estrutura 2	CDR2
HBL1	3D11	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	SISGSGDTIYVADSVRG
	3C12	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	SISGSGDTIYVADSVRG
	3D9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	SISGSGDTIYVADSVRG
HBL2a	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	GIGGSGSCTIVYADSVKG
HBL2b	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	YIIGGSGSCTIVYADSVKG
HBL2c	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	YIIGGSGSCTIVYADSVKG
HBL3c	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	YIIGGSGSCTIVYADSVKG
HBL3d	3C1	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	YIIGGSGSCTIVYADSVKG
HBL3e	3B10	LEEQVQLVESPCCGGVVWPGGSQRQLSCAASGFTFR	NYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	YIILYDGSKKYYVDSVKG
HBL4a	3C1	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	SISGSGDTIYVADSVKG
	3D9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	SISGSGDTIYVADSVKG
HBL4b	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	YIISGSGSCTIVYADSVKG
HBL4c	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	YIISGSGSCTIVYADSVKG
HBL4d	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	YIISGSGSCTIVYADSVKG
KBL5	3D1	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWIS	GIVGIGGDTKYGDSVKG
YBL4c	3B9	LEEVQVLLESGGGLVWPGCSLRLSCAASGFRFG	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	YIISGSGSCTIVYADSVKG
HBL7	3G5	LEEVQVLVESPCCGGGVWPGGSQRQLSCAASGFTFS	RYDWH	WVRQAPGKGLEWVA	LISYDGMYKSSADSVRG

Fab	Estrutura 3	CDR3		
		DH	JH	
HBL1	3D11	RFTISKDSSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
	3C12	RFTISKDSSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
	3D9	RFTISKDSSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL2a	3B8	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL2b	4B6	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
	5C9	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL2c	3B9	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL2d	5C4	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL3	3B10	RFTVSRDNTSNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	DLLAGGGYEGG	FDWNGGGALVTVSS
HBL4a	3H1	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
	3D5	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL4b	3B5	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL4c	3B6	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL4d	3B10	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL5	3D1	RFTISRDNSKIVVYLOMNGLRLVDDTTAVYYCAK	SAYYVSCSYGG	FDWNGGGALVTVSS
HBL6	3F1	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	GSIFGTAKVYG	FDWNGGGALVTVSS
HBL7	3G5	RFTVSEHNSRNTLFLQLNSLRLVDDTTAVYYCAK	SDVMARAGSG	FDWNGGGALVTVSS

Fig 8d

## Cadeia leve

Fab		Estrutura 1	CDR1	Estrutura 2	CDR2
HBL1	3D11	SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC	GGNTIGSQSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
	3C12	SRSYVLTOPPSVSVAPGQTASIAC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
	3D9	SRSYELTOPPSVSVAPRTDQITC	GEDKIESKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL2a	3D15	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL2b	3D8	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
	3D6	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL2c	3D9	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
	3D4	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL3	3B10	SRSYVLTOPPSVSVAPGOTAKIIC	GGNNIGAKSVQ	WYQDQPGQAPVIVVY	DDTERPS
HBL4a	3C11	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
	3D6	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL4b	3D5	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL4c	3D8	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL4d	3D2	SRSYVLTOPPSVSVAPCQDQITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL5	3D1	SRSYVLTOPPSVSVAPGQTARITC	GGNTIGSKSVH	WYQQKPGQAPVIVVY	DDSDRPS
HBL7	3G5	SRSYVLTOPPSVSVAPGQTARITC	GGNNIGSKSAH	WYQQRPGQAPVIVVY	DDSDRPS

Fab		Estrutura 3	CDR3	
				JL
HBL1	3D11	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 163)
	3C12	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 164)
	3D9	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 165)
HBL2a	3D5	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 166)
HBL2b	3D8	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 167)
	3D6	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 168)
HBL2c	3D9	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 169)
	3D4	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTRLTVL (Seq. ID N° 170)
HBL3	3B10	AIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTKLAVL (Seq. ID N° 171)
HBL4a	3C11	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTKLAVL (Seq. ID N° 172)
	3D6	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTKLAVL (Seq. ID N° 173)
HBL4b	3D5	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTKLAVL (Seq. ID N° 174)
HBL4c	3D8	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTKLAVL (Seq. ID N° 175)
HBL4d	3D2	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSSDH	--VVFGGGTKLAVL (Seq. ID N° 176)
HBL5	3D1	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSTGDR	--VVFGGGTKLTVL (Seq. ID N° 177)
HBL7	3G5	GIPERFSGNSNCGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QWWDSTGDR	--VVFGGGTKLTVL (Seq. ID N° 178)

HBL2d 3C4 possui um codão de interrupção "tga" em CDR1 conforme indicado por "J"

Fig 8e

## Clones de kapa de IgG de Murganho contra Fc de IgE

## Cadeia Pesada

Fab	Estrutura 1	CDR1	Estrutura 2	CDR2
m2G1R2A8	QSGAELMKPGASVKISCKATDYTFS	NYWIE	WVKQRPQHGLEYWIG	EILPGSGSTNFNEKFKG
m2G1R2B9	.....I.....RT.....	....R.....	....T*D.....R	
m2G1R2B11, C5	.....	....I.....	....D.....R.....D	
m2G1R2C2, F9, c3	....V.....S.....	....S.....	....D.....D.....V.....	
m2G1R2C8	.....	....S.....	....D.....V.....	
m2G1R2F12	.....	....	....D.....	
m2G1R2G1, C11	.....S.....	....	....T*D.....R	
m2G1R2H8	.....	....	....	
m2G1R2F7	.....	....	D.....D.....V.....	
m2G1R2D10	.....	....	....D.....	
m2G1R2F10	.....	....	....D.....	
m2G1R2H3	.....S.....	....	....DA.....	
m2G1R2H7	....V.....S.....	....	....D.....VS.....	
m2G1R2a9	.....	....	....D.....	

Fab	Estrutura 3	CDR3	FR4
m2G1R2A8	KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	AYFTFS	LDYWGGQGTTLTVSS (Seq. ID N° 233)
m2G1R2B9	.....	....F.....	(Seq. ID N° 234)
m2G1R2B11, C5	.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 235)
m2G1R2C2, F9, c3	....Y.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 236)
m2G1R2C8	....L*Y.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 237)
m2G1R2F12	.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 238)
m2G1R2G1, C11	.....	....F.....	(Seq. ID N° 239)
m2G1R2H8	.....	....F.....	(Seq. ID N° 240)
m2G1R2F7	.....	....Y*L....F.....	(Seq. ID N° 241)
m2G1R2D10	....Y.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 242)
m2G1R2F10	....S.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 243)
m2G1R2H3	....Y.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 244)
m2G1R2H3	....Y.....	....Y....F.....	(Seq. ID N° 245)
m2G1R2a9	.....	....Y*L....F.....	(Seq. ID N° 246)

Fig. 9a

## Clones de lambda de IgG de Murganho contra Fc de IgE

## Cadeia Pesada

Fab	Estrutura 1	CDR1	Estrutura 2	CDR2
m3G1R3A11	GAELMKPGASVKISCKATGYTFN	TYWIE	WVKQRPQHGLEYWIG	EILPGTDNTNYNEKFKG
m3G1R3A12	••••••••••••••••••••••	•••••	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G1R3D12	••••••••••••••••••••••	•••••	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G1R3G8	••••••••••••••••••••••	•••••	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G1R3E9	••••••••••••••••••••••	•••••	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G1R3B10	GAELMKPGASVKISCKATGYTLS	SYWIE	WVKQRPQHGLEYWIG	EILPGTDNTNYNEKFKG
m3G1R3B11	ooooooooooooooooooooooTLS	oooooooo	oooooooooooooooo	oooooooooooooooo
m3G1R3F11	ooooooooooooooooooooooTLS	oooooooo	oooooooooooooooo	oooooooooooooooo
m3G1R3H9	ooooooooooooooooooooooTLS	oooooooo	oooooooooooooooo	oooooooooooooooo
m3G1R3E7	LVDPGGGLVLQPGGSLRLSCETSGFTFT	DYLYS	WVRQPPKGAKLEWLW	FIRNKANGYTTTEYSASVKG
m3G1R3E10	••••••••••••••••••••••	••••MT	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G1R3F8	••••••••••••••••••••••	••••LS	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G1R3G9	••••••••••••••••••••••	••••LS	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G1R3B7	GAELMKPGASVKISCKATGYTFN	DYWIE	WVKQRPQHGLEYWIG	EILPGTDNTNYNEKFKG
m3G1R3C7	ooooooooooooooooooooooTLS	oooooooo	oooooooooooooooo	oooooooooooooooo
m3G1R3G12	ooooooooooooooooooooooTLS	oooooooo	oooooooooooooooo	oooooooooooooooo
m3G2aR3C8	QLOQOSOTooooooooooooooTLS	oooooooo	oooooooooooooooo	oooooooooooooooo
m3G2aR3F7	QLOQOSOTooooooooooooooTLS	oooooooo	QYoooooooooooo	QDoooooooooooo
m3G2aR3B10	GGGLVLQPGGSLRLSCETSGFTFT	DYLYS	WVRQPPKGAKLEWLW	FIRNKANGYTTTEYSASVKG
m3G2aR3E10	••••••••••••••••••••••	•••••	••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••
m3G2aR3D8	••••••••••••••••••••••	S	••••M	••••A
m3G2aR3D4	WQOSGAELMKPGASVKISCKATGYTFN	SYWIE	WVKQRPQHGLEYWIG	EILPGTDNTNYNEKFKG
m3G2aR3F4	ooooooooooooooooooooooTLS	oooooooo	oooooooooooooooo	oooooooooooooooo

Fig. 9b

Fab	Estrutura 3	CDR3	FR4
m3G1R3A11	KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	QVGLRWF	FDYWGQGTTLTVSS
m3G1R3A12	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 248)
m3G1R3D12	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 249)
m3G1R3G8	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 250)
m3G1R3E9	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 251)
m3G1R3B10	KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	QVGLRWY	FDYWGQGTTLIVSS
m3G1R3B11	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 252)
m3G1R3F11	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 253)
m3G1R3H2	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 254)
m3G1R3E7	RFTISRDDSQSILYLMQNTLRAEDSATYYCLR	NGRPYYYALDYWGQGTSVSVSS	(Seq. ID Nº 255)
m3G1R3E10	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 256)
m3G1R3F8	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 257)
m3G1R3G9	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 258)
m3G1R3B7	KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	GLWLRGWWFDYWGQGTTLTVSS	(Seq. ID Nº 259)
m3G1R3C7	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 260)
m3G1R3C12	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 261)
m3G2aR3C2	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 262)
m3G2aR3H7	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 263)
m3G2aR3H7	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 264)
m3G2aR3B10	RFTISRDDSQSILYLMQNTLRAEDSATYYCAR	HGRPYYYLMDYWGQGTSVTVSS	(Seq. ID Nº 265)
m3G2aR3E10	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 266)
m3G2aR3D8	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 267)
m3G2aR3D4	KWTFADISGNFAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	TTIVVWFDYLDYMCQGTTLTVSS	(Seq. ID Nº 268)
m3G2aR3B4	••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••••••••••••••••••••••	(Seq. ID Nº 269)

Fig. 9c

Cadeia leve kapa

Fab	Estrutura 1	CDR1	Estrutura 2	CDR2
m3G1R3B10	SRQIVLTQSPAIMSASPGEKVMTTC	SASSSVSYMH	WYQQKSSTSPKLWIY	DTSKLAS
m3G1R3H9	.....	.....	.....	.....
m3G1R3E7	SRQIVLTQSPAIMSASPGEKVMTTC	SASSSVSYMH	WYQQKSCTSPKLWIY	DTSKLAS
m3G1R3C7	.....	.....	.....	.....
m3G1R3D12	SRQIVLTQSPAIMSASPGEKVMTTC	SASSSVSYMH	WYQQKSSTSPKLWIY	DTSKLAS
m3G1R3E9	.....	.....	.....	.....
m3G1R3F7	SRDIIQMTOSDASLEASVGETWTTTC	RASENTNSYLA	WFOOKQCKSPDILVY	DAKTLAS
m3G2aR3D8	.....	.....	.....	.....
m3G2aR3E10	.....	.....	.....	.....

Fab	Estrutura 3	CDR3	FR4
m3G1R3B10	GVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYC	FQGSGYP LT FGAGTKLEIKR	(Seq. ID № 270)
m3G1R3H9	.....	.....	(Seq. ID № 271)
m3G1R3E7	GVPGRFSGSGSGCTSYELTISSMEAEDVATYYC	QWVWNPV PT FGAGTKLEIKR	(Seq. ID № 272)
m3G1R3C7	.....	.....	(Seq. ID № 273)
m3G1R3D12	GVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYC	FQGSGYP LT FGAGTKLEIKR	(Seq. ID № 274)
m3G1R3E9	.....	.....	(Seq. ID № 275)
m3G1R3F7	GVPGRFSGSGSGCTSYELKNSIOPEDFGSYTC	QWVWNPV LT FGAGTKLEIKR	(Seq. ID № 276)
m3G2aR3D8	.....	.....	(Seq. ID № 277)
m3G2aR3E10	.....	.....	(Seq. ID № 278)

Fig. 9d

## **RESUMO**

### **"MOLDES MANIPULADOS E SUA UTILIZAÇÃO EM AMPLIFICAÇÃO COM INICIADOR ÚNICO"**

Foram agora desenvolvidos métodos de amplificação de ácido nucleico que incluem os passos de: a) emparelhamento um iniciador com uma sequência de ácido nucleico molde, possuindo o iniciador uma primeira porção que emparelha com o molde e uma segunda porção da sequência pré-determinada; b) síntese de um polinucleótido que emparelha com e é complementar com a porção do molde entre a localização na qual a primeira porção do iniciador emparelha com o molde e a extremidade do molde, possuindo o polinucleótido uma primeira extremidade e uma segunda extremidade, em que a primeira extremidade incorpora o iniciador; c) separação do polinucleótido sintetizado no passo (b) do molde; d) emparelhamento de um oligonucleótido interno com a segunda extremidade do polinucleótido sintetizado no passo (b), possuindo o oligonucleótido interno uma primeira porção que emparelha com a segunda extremidade do polinucleótido e uma segunda porção possuindo a mesma sequência pré-determinada da segunda porção do iniciador; e) extensão do polinucleótido sintetizado no passo (b) para proporcionar uma sua porção terminal que é complementar da sequência pré-determinada; e f) amplificação do polinucleótido estendido utilizando um iniciador único possuindo a sequência pré-determinada.