

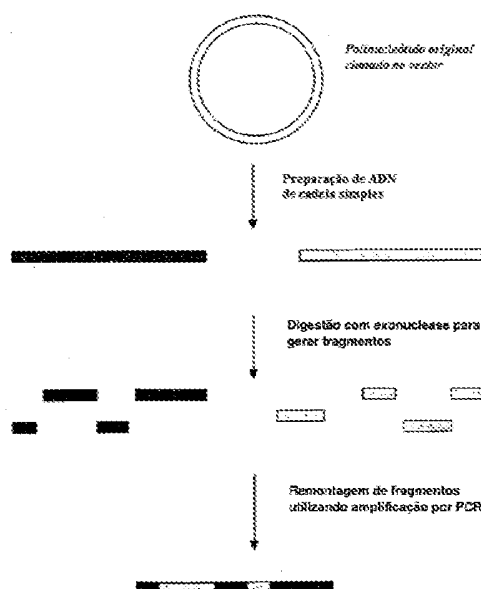
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.11.17	(73) Titular(es): ALLIGATOR BIOSCIENCE AB	
(30) Prioridade(s): 2005.11.19 GB 0523582	SCHEELEVÄGEN 19A 223 70 LUND	SE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.07.30	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.07.13 174/2011	CHRISTINA FUREBRING	SE
	ANN-CHRISTIN MALMBORG HAGER	SE
	KARIN HARALDSSON	SE
	MARIE KARLSSON	SE
	FREDRIK KARLSSON	SE
	(74) Mandatário:	
	ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA	
	RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA EVOLUÇÃO MOLECULAR IN VITRO DA FUNÇÃO PROTEICA**

(57) Resumo:

O INVENTO PROPORCIONA UM MÉTODO PARA A GERAÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA POLINUCLEOTÍDICA OU POPULAÇÃO DE SEQUÊNCIAS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS POLINUCLEOTÍDICAS ORIGINAIS, COMPREENDENDO O MÉTODO OS PASSOS DE (A) PROPORCIONAR UMA PRIMEIRA POPULAÇÃO DE MOLÉCULAS POLINUCLEOTÍDICAS E UMA SEGUNDA POPULAÇÃO DE MOLÉCULAS POLINUCLEOTÍDICAS, A PRIMEIRA E SEGUNDA POPULAÇÕES JUNTAS CONSTITUINDO AS CADEIAS MAIS E MENOS DAS SEQUÊNCIAS POLINUCLEOTÍDICAS ORIGINAIS, (B) DIGESTÃO DA PRIMEIRA E SEGUNDA POPULAÇÕES DE MOLÉCULAS POLINUCLEOTÍDICAS COM UMA NUCLEASE PARA GERAR FRAGMENTOS POLINUCLEOTÍDICOS, (C) CONTACTO DOS REFERIDOS FRAGMENTOS POLINUCLEOTÍDICOS GERADOS A PARTIR DAS CADEIAS MAIS COM OS FRAGMENTOS GERADOS A PARTIR DAS CADEIAS MENOS E (D) AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS QUE SE LIGAM UNS AOS OUTROS PARA GERAR PELO MENOS UMA SEQUÊNCIA POLINUCLEOTÍDICA CODIFICANDO UM OU MAIS MOTIVOS PROTEICOS POSSUINDO UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ALTERADA EM COMPARAÇÃO COM OS CODIFICADOS PELOS POLINUCLEÓTIDOS ORIGINAIS, EM QUE O GRAU DE VARIABILIDADE DA SEQUÊNCIA NUMA REGIÃO SELECIONADA DA PELO MENOS UMA MOLÉCULA POLINUCLEOTÍDICA PRODUZIDA NO PASSO (D) É CONTROLADO ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE UM OU MAIS OLIGONUCLEÓTIDOS DE VARIABILIDADE PREDETERMINADA, CUJOS OLIGONUCLEÓTIDOS SE LIGAM A UMA SEQUÊNCIA QUE RESIDE ENTRE, MAS EXCLUI, O NUCLEÓTIDO TERMINAL 3' OU 5' DA MOLÉCULA POLINUCLEOTÍDICA ORIGINAL. O INVENTO PROPORCIONA TAMBÉM POLINUCLEÓTIDOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO DO INVENTO E POLIPÉPTIDOS CODIFICADO PELOS MESMOS.

RESUMO**"Método para evolução molecular *in vitro* da função proteica"**

O invento proporciona um método para a geração de uma sequência polinucleotídica ou população de sequências a partir de sequências polinucleotídicas originais, compreendendo o método os passos de (a) proporcionar uma primeira população de moléculas polinucleotídicas e uma segunda população de moléculas polinucleotídicas, a primeira e segunda populações juntas constituindo as cadeias mais e menos das sequências polinucleotídicas originais, (b) digestão da primeira e segunda populações de moléculas polinucleotídicas com uma nuclease para gerar fragmentos polinucleotídicos, (c) contacto dos referidos fragmentos polinucleotídicos gerados a partir das cadeias mais com os fragmentos gerados a partir das cadeias menos e (d) amplificação dos fragmentos que se ligam uns aos outros para gerar pelo menos uma sequência polinucleotídica codificando um ou mais motivos proteicos possuindo uma sequência de aminoácidos alterada em comparação com os codificados pelos polinucleotídeos originais, em que o grau de variabilidade da sequência numa região seleccionada da pelo menos uma molécula polinucleotídica produzida no passo (d) é controlado através da adição de um ou mais oligonucleótidos de variabilidade predeterminada, cujos oligonucleótidos se ligam a uma

sequência que reside entre, mas exclui, o nucleótido terminal 3' ou 5' da molécula polinucleotídica original. O invento proporciona também polinucleótidos obtidos através do método do invento e polipéptidos codificado pelos mesmos.

DESCRIÇÃO**"Método para evolução molecular *in vitro* da função proteica"**

O presente invento refere-se a um método para evolução molecular *in vitro* da função proteica que permite controlo sobre a variabilidade introduzida em regiões seleccionadas de uma proteína original.

A função proteica pode ser modificada e melhorada *in vitro* através de uma variedade de métodos, incluindo mutagénesis dirigida ao local (Alber *et al.*, *Nature*, 5: 330(6143): 41-46, 1987) clonagem combinatória (Huse *et al.*, *Science*, 246: 1275-1281, 1989; Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10: 779-783, 1992) e mutagénesis aleatória combinada com sistemas de selecção apropriados (Barbas *et al.*, *PNAS. USA*, 89: 4457-4461, 1992).

O método de mutagénesis aleatória juntamente com selecção foi utilizado em vários casos para melhorar a função proteica e existem duas estratégias diferentes. Primeiramente, a aleatorização de toda a sequência génica em combinação com a selecção de uma proteína variante (mutante) com as características desejadas, seguido de um novo ciclo de mutagénesis aleatória e selecção. Este método pode então ser repetido até ser encontrada uma proteína variante que seja considerada óptima (Schier R. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 263 (4): 551-567, 1996). Aqui, a via tradicional para introduzir mutações é através de PCR propensa a erro (Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15, 1989) com uma taxa de mutação de aproximadamente 0,7%. Secundariamente, regiões definidas do gene podem ser mutagenizadas/mutadas com iniciadores degenerados, o que permite taxas de mutação de até 100% (Griffiths *et al.*, *EMBO. J.*, 13: 3245-3260, 1994; Yang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 254: 392-403, 1995).

A mutação aleatória tem sido utilizada extensivamente no campo da engenharia de anticorpos. Genes de anticorpos formados *in vivo* podem ser clonados *in vitro* (Larrick *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 1250-1256, 1989) e combinações aleatórias dos genes codificando as cadeias pesadas e leves variáveis podem ser sujeitas a selecção

(Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10: 779-783, 1992). Os fragmentos funcionais de anticorpos seleccionados através destes métodos podem ainda ser melhorados utilizando mutagénese aleatória e ciclos adicionais de selecções (Schier, R. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 263(4): 551-567, 1996).

Tipicamente a estratégia de mutagénese aleatória é seguida de selecção. As variantes com características interessantes podem ser seleccionadas e as regiões de ADN mutadas de diferentes variantes, cada uma com características interessantes, combinadas numa sequência de codificação (Yang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 254: 392-403, 1995).

O emparelhamento combinatório de genes tem também sido utilizado para melhorar a função proteica, p.ex. afinidade do anticorpo (Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10: 779-783, 1992).

Outro processo conhecido para mutação *in vitro* da função proteica, que é frequentemente referido como "baralhamento de ADN", utiliza fragmentação aleatória de ADN e montagem dos fragmentos numa sequência de codificação funcional (Stemmer, *Nature* 370: 389-391, 1994). O processo de baralhamento de ADN gera diversidade através de recombinação, combinando mutações úteis de genes individuais. Tem sido utilizado com sucesso para evolução artificial de diferentes proteínas, p.ex. enzimas e citocinas (Chang *et al.* *Nature Biotech.* 17: 793-797, 1999; Zhang *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4504-4509, 1997; Christians *et al.* *Nature Biotech.* 17: 259-264, 1999). Os genes são fragmentados aleatoriamente utilizando ADNase I e depois novamente montados através de recombinação uns com os outros. O material de partida pode ser um único gene (primeiro mutado aleatoriamente utilizando PCR propensa a erro) ou sequências homólogas de ocorrência natural (chamado baralhamento de famílias).

A ADNase I hidrolisa ADN de preferência em locais adjacentes a nucleótidos pirimidina, portanto é uma escolha adequada para fragmentação aleatória de ADN. No entanto, a actividade está dependente de iões de Mg ou Mn, os iões Mg restringem o tamanho dos fragmentos a 50 pb, enquanto os iões de Mn darão tamanhos de fragmentos inferiores a 50 pb. Portanto, para ter todos os tamanhos possíveis para

recombinação o gene em questão necessita ser tratado pelo menos duas vezes com ADNase I na presença de qualquer um dos dois iões diferentes, seguido de remoção destes mesmos iões.

Embora, em teoria, seja possível baralhar ADN entre quaisquer clones, se se pretender que o gene baralhado resultante seja funcional em relação à expressão e actividade, os clones a baralhar têm de preferência de ser aparentados ou mesmo idênticos, com excepção de um baixo nível de mutações aleatórias. O baralhamento de ADN entre clones geneticamente diferentes produzirá geralmente genes não funcionais.

O presente invento tenta proporcionar melhores métodos para evolução proteica *in vitro*. Em particular, o invento tem por objectivo proporcionar um método que permita o controlo do grau de variabilidade introduzido em regiões seleccionadas de uma sequência polinucleotídica original.

Assim, de acordo com um primeiro aspecto do presente invento, é proporcionado um método para geração de uma molécula polinucleotídica variante, ou população desta, a partir de uma molécula polinucleotídica original, compreendendo o método os passos:

(a) proporcionar uma primeira população de moléculas polinucleotídicas e uma segunda população de moléculas polinucleotídicas, a primeira e a segunda populações juntas constituindo as cadeias mais e menos de uma molécula polinucleotídica original;

(b) digestão da primeira e segunda populações de moléculas polinucleotídicas com uma nuclease para gerar fragmentos polinucleotídicos;

(c) contacto dos referidos fragmentos polinucleotídicos gerados a partir das cadeias mais com fragmentos gerados a partir das cadeias menos (sob condições que permitam a ligação dos fragmentos); e

(d) amplificação dos fragmentos que se ligam uns aos outros para gerar pelo menos uma molécula polinucleotídica que difira na sequência da molécula polinucleotídica original em que o grau de variabilidade da sequência numa região seleccionada da pelo menos uma molécula polinucleotídica produzida no passo (d) é controlado através da adição de um

ou mais oligonucleótidos de variabilidade predeterminada, cujos oligonucleótidos se ligam à sequência que reside entre, mas exclui, os nucleótidos terminais 3' e 5' da molécula polinucleotídica original.

Uma vantagem chave proporcionada pelos métodos do presente invento é que eles permitem o controlo do grau de variabilidade da sequência introduzido nas sequências polinucleotídicas originais, através da adição de um ou mais oligonucleótidos de variabilidade predeterminada. Tais oligonucleótidos são capazes de se ligar (de preferência sob condições de elevado rigor) a uma sequência alvo interna presente numa ou mais das sequências polinucleotídicas originais.

Os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são capazes de se ligar a uma sequência interna que reside entre, mas exclui, o nucleótido terminal 3' ou 5' da molécula polinucleotídica original (de modo a que os oligonucleótidos não sejam capazes de se ligar aos nucleótidos terminais 3' ou 5'). Assim, não se pretende que o termo "oligonucleótidos de variabilidade predeterminada" englobe as sequências iniciadoras da extremidade 3' ou 5' ou um molde inteiro. No entanto, será apreciado que o passo (c) possa adicionalmente compreender a adição de sequências iniciadoras que se ligam às extremidades 3' e/ou 5' de pelo menos um dos polinucleótidos originais sob condições de ligação.

Numa concretização preferida do método do invento, em que a primeira e a segunda populações de polinucleótidos são de cadeia simples, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são adicionados antes ou no passo (b) e a nuclease utilizada para digerir os polinucleótidos originais é específica para polinucleótidos de cadeia simples (por exemplo, nuclease S1, Exo I, Exo T e nuclease do feijão-da-china). Quando assim adicionados, os oligonucleótidos ligam-se/hibridam com a primeira e segunda populações de polinucleótidos originais de cadeia simples, produzindo deste modo regiões de cadeia dupla que estão assim protegidas da digestão com nuclease específica de cadeia simples (ver Figura 2). Consequentemente, a variabilidade dentro desta

sequência protegida é controlada nos polinucleótidos variantes resultantes produzidos no passo (d).

Numa concretização preferida alternativa, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são adicionados após o passo (b) e antes ou no passo (c). Nesta concretização, os fragmentos polinucleotídicos produzidos através da digestão com nuclease são "complementados" com os oligonucleótidos, que são então incorporados durante o processo de re-ligação/hibridação nos polinucleótidos variantes produzidos no passo (d) (ver Figura 3). Novamente, é preferido que a primeira e segunda populações de polinucleótidos sejam de cadeia simples nesta concretização.

O controlo da variabilidade introduzida nos polinucleótidos variantes produzidos utilizando o método do invento é alcançado através da utilização de oligonucleótidos de variabilidade predeterminada. Por exemplo, oligonucleótidos incorporando graus variáveis de variabilidade da sequência nucleotídica (de nenhuma variabilidade a elevada variabilidade) podem ser produzidos utilizando métodos bem conhecidos na arte, tal como uma PCR propensa a erro ou utilização de um sintetizador de oligonucleótidos (tal como os comercialmente disponíveis em MWG Biotech, Ebersberg, Alemanha). Assim, será apreciado que o conhecimento da sequência dos oligonucleótidos de variabilidade predeterminada não é essencial; o que é importante é que o grau de variabilidade dentro dos oligonucleótidos seja conhecido (pelo menos num sentido relativo, se não num sentido absoluto).

Vantajosamente, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência interna de uma sequência polinucleotídica original, por exemplo pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência. A percentagem de identidade de sequência entre dois polinucleótidos pode ser determinada utilizando programas de computador adequados, muitos dos quais estão disponíveis em linha (por exemplo ver www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/nuc-mult.html).

Por exemplo, a identidade de sequência pode ser analisada utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.*, (1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-80). Os parâmetros utilizados podem ser como se segue:

Parâmetros de alinhamento rápido aos pares: tamanho K-tuple (palavra); 1, tamanho da janela; 5, penalidade de intervalo; 3, número de diagonais de topo; 5. Método de classificação: x por cento.

Parâmetros de alinhamento múltiplo: penalidade de intervalo aberto; 10, penalidade de prolongamento do intervalo; 0,05. Matriz de registo: BLOSUM.

Numa concretização preferida, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham 100% de identidade de sequência com a sequência interna de uma sequência polinucleotídica original. Assim, os oligonucleótidos podem ser todos da mesma sequência nucleotídica.

Numa concretização alternativa, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são de pelo menos duas sequências diferentes. De preferência, os oligonucleótidos são variantes da mesma sequência interna da sequência polinucleotídica original.

Será apreciado que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada podem ser dirigidos à mesma sequência interna ou sequências internas diferentes dos polinucleótidos originais.

Numa concretização preferida, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham 100% de identidade de sequência com, ou são variantes de, pelo menos duas regiões diferentes dos polinucleótidos originais.

Será apreciado que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada podem ter qualquer comprimento desde que não constituam um molde inteiro. De preferência, no entanto, os oligonucleótidos estão entre 10 e 500 nucleótidos de comprimento. De preferência, os oligonucleótidos têm entre 50 e 200 nucleótidos de comprimento, por exemplo cerca de 100 nucleótidos de comprimento.

O invento proporciona um método para geração de formas variantes de uma sequência polinucleotídica original.

Será apreciado que o método do invento pode ser realizado em qualquer polinucleótido que codifique um produto polipeptídico, incluindo quaisquer proteínas possuindo propriedades de ligação ou catalíticas, p.ex. anticorpos ou partes de anticorpos, enzimas ou receptores. Além disso, qualquer polinucleótido que tenha uma função que possa ser alterada, tal como ARN catalítico, pode ser mutado de acordo com o presente invento. É preferível que o polinucleótido original codificando um ou mais motivos proteicos tenha pelo menos 12 nucleótidos de comprimento, de maior preferência pelo menos 20 nucleótidos de comprimento, ainda de maior preferência mais de 50 nucleótidos de comprimento. Podem ser utilizados polinucleótidos tendo pelo menos 100 nucleótidos de comprimento ou mesmo pelo menos 200 nucleótidos de comprimento. Quando são utilizados polinucleótidos originais que codificam grandes proteínas tais como enzimas ou anticorpos, estes podem ter muitas centenas ou milhares de bases de comprimento. O presente invento pode ser realizado num polinucleótido original de qualquer tamanho.

Vantajosamente, a sequência alterada de pelo menos uma molécula polinucleotídica produzida no passo (d) está associada a uma propriedade ou característica alterada do polinucleótido ou polipéptido codificado deste modo.

A propriedade ou característica alterada de um polinucleótido ou polipéptido gerado através do método do invento pode ser qualquer variação ou alteração na actividade normal do polinucleótido de tipo selvagem (original) ou do polipéptido, proteína ou motivos proteicos que codifica. Por exemplo, os métodos do invento podem ser aplicados como se segue:

- (i) para modular, positivamente ou negativamente, a actividade catalítica de uma enzima;
- (ii) para modular a especificidade e/ou afinidade de ligação de um anticorpo;
- (iii) para modular a especificidade e/ou afinidade de ligação de uma interacção ligando-receptor, p.ex. entre uma

interleucina e seu receptor (através da produção de variantes do ligando e/ou do receptor);

(iv) para modular a capacidade de um monómero polipeptídico para formar formações multiméricas, p.ex. em proteínas de revestimento de vírus para vacinas;

(v) para modular a capacidade de um imunogénio para estimular a produção de anticorpos específicos contra ele; e

(vi) para modular a estabilidade de uma proteína (p.ex. a estabilidade sérica de hormonas e factores de crescimento).

Assim, será apreciado que os métodos do invento podem ser utilizados para alterar uma propriedade/função de qualquer proteína, polipéptido ou polinucleótido.

Os métodos para testar os polinucleótidos ou polipéptidos variantes gerados através do método do invento quanto às propriedades alteradas são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a selecção de proteínas funcionais a partir de bibliotecas moleculares tem sido revolucionada através do desenvolvimento da tecnologia de apresentação fágica (Parmley *et al.*, *Gene*, 73: 305-391 1988; McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554, 1990; Barbas *et al.*, *PNAS. USA*, 88: 7978-7982, 1991). Neste método, o fenótipo (proteína) está directamente ligado ao seu correspondente genótipo (ADN) e isto permite a clonagem directa do material genético, que pode então ser sujeito a mais modificações para melhorar a função proteica. A apresentação fágica tem sido utilizada para clonar ligadores funcionais a partir de uma variedade de bibliotecas moleculares com até 10^{11} transformantes de tamanho (Griffiths *et al.*, *EMBO. J.* 13: 3245-3260, 1994). Assim, a apresentação fágica pode ser utilizada para clonar directamente ligadores funcionais a partir de bibliotecas moleculares, e pode também ser utilizada para melhorar mais os clones originalmente seleccionados. Outros tipos de vírus que foram utilizados para expressão à superfície de bibliotecas proteicas e selecções destas são os baculovírus (Boublik *et al.* *Biotechnol.* 13: 1079-1084, 1995; Mottershead *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Com.* 238: 717-722, 1997; Grabherr *et al.* *Biotechniques* 22: 730-735, 1997) e retrovírus (Buchholz *et al.* *Nature Biotechnol.* 16: 951-954, 1998).

A selecção de proteínas funcionais a partir de bibliotecas moleculares pode também ser efectuada através de apresentação à superfície celular. Também aqui, o fenótipo está directamente ligado ao seu genótipo correspondente. A apresentação à superfície de células bacterianas tem sido utilizada para p.ex. pesquisa de variantes melhoradas de carboximetil-celulase (CMCase) (Kim *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 66: 788-93, 2000). Outras células que podem ser utilizadas para este fim são células de levedura (Boder e Wittrup *Nat. Biotechnol.* 15: 553-557, 1997), células COS (Higuchi *et al. J. Immunol. Meth.* 202: 193-204, 1997) e células de insecto (Granzerio *et al. J. Immunol. Meth.* 203: 131-139, 1997; Ernst *et al. Nucleic Acids Res.* 26: 1718-1723, 1998).

O polinucleótido original codifica de preferência um ou mais motivos proteicos. Estes são definidos como regiões ou elementos da sequência polinucleotídica que codificam uma sequência polipeptídica (i.e. de aminoácidos) que tem uma função proteica característica. Por exemplo, um motivo proteico pode definir uma porção de uma proteína inteira, tal como um epitopo, um local de clivagem ou um local catalítico, etc.

Várias bases de dados pesquisáveis de motivos proteicos e potenciais motivos proteicos estão disponíveis, tais como MOTIF, PROSITE, SMART e BLOCKS (www.blocks.fhcrc.org).

De preferência, a região seleccionada da molécula polinucleotídica original na qual o grau de variabilidade é controlado corresponde a (i.e. codifica) um ou mais tais motivos proteicos. Assim, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada podem ser dirigidos a uma sequência interna da molécula polinucleotídica original que codifica um motivo proteico.

Será apreciado por peritos na arte que o método do invento pode ser operado utilizando, como polinucleótido original, qualquer material de partida de ácido nucleico capaz de hibridar para formar sequências nucleotídicas de cadeia dupla complementares, por exemplo ADN genómico (ADNg)

ou ADN complementar (ADNc). De preferência, a primeira e segunda populações de polinucleótidos são ADNc.

Numa concretização preferida, a primeira e segunda populações de polinucleótidos são de cadeia simples.

Convenientemente, a primeira população de polinucleótidos consiste em cadeias mais das moléculas polinucleotídicas originais e a segunda população de polinucleótidos consiste em cadeias menos de moléculas polinucleotídicas originais. Alternativamente, a primeira e/ou segunda população de polinucleótidos pode compreender ambas as cadeias mais e menos das moléculas polinucleotídicas originais.

Tal como afirmado acima, o método do invento pode ser utilizado para produzir formas variantes de qualquer sequência polinucleotídica original.

Vantajosamente, as sequências polinucleotídicas originais são derivadas através de mutagénese de uma única sequência polinucleotídica original, i.e. as sequências polinucleotídicas originais constituem formas variantes de uma única sequência polinucleotídica. A mutação aleatória de uma sequência polinucleotídica original pode ser alcançada através de qualquer método convencional tal como descrito acima, tal como PCR propensa a erro.

Numa concretização preferida do método do invento, as sequências polinucleotídicas originais codificam um polipéptido ligando. Por "polipéptido ligando" incluímos qualquer polipéptido que interaja *in vivo* ou *ex vivo* com outra molécula biológica (tal como outro polipéptido ou um polinucleótido). De preferência, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando uma sequência de aminoácidos que interage, directamente ou indirectamente, com uma molécula biológica, por exemplo um local de ligação ou local modulador.

Noutra concretização preferida, as sequências polinucleotídicas originais codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo tal como moléculas semelhantes a Fab (Better *et al. Science* 240: 1041, 1988); moléculas Fv (Skerra *et al. Science* 240: 1038, 1988); moléculas Fv de cadeia simples (ScFv) (Bird *et al. Science* 242: 423, 1988; Huston *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879, 1988) e anticorpos de domínio simples (dAbs) (Ward *et al. Nature* 341: 544, 1989). Nesta concretização, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham de preferência identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando uma região determinante de complementaridade (CDR). Alternativamente, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada podem partilhar identidade de sequência com, ou ser variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando um polipéptido estrutural.

Noutra concretização preferida, as sequências polinucleotídicas originais codificam uma enzima ou fragmento cataliticamente activo desta. Embora o termo "enzima" seja utilizado, este deve ser interpretado como incluindo também qualquer polipéptido possuindo actividade semelhante a uma enzima, i.e. uma função catalítica. Por exemplo, os polipéptidos fazendo parte de uma enzima podem ainda possuir função catalítica. Além disso, proteínas tais como interferões e citocinas estão incluídas. Nesta concretização, os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham de preferência identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando o local activo, ou local modulador (tal como um local regulador alostérico, p.ex. um local de ligação de um cofactor) ou uma região envolvida na estabilidade de uma enzima (tal como um local de clivagem por proteases).

Ainda noutra concretização preferida, as sequências polinucleotídicas originais codificam um antigénio. Por "antigénio", incluímos péptidos antigénicos capazes de induzir uma resposta imunitária quando administrados, de forma aguda ou crónica, a um hospedeiro mamífero. Nesta concretização, os oligonucleótidos de variabilidade

predeterminada partilham de preferência identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando um epitopo.

Será apreciado por peritos na arte que qualquer nuclease possa ser utilizada no passo de digestão (b) para gerar fragmentos polinucleotídicos, por exemplo exonucleases, endonucleases ou enzimas de restrição, ou combinações destas. Os fragmentos digeridos individuais são purificados, misturados e novamente montados com tecnologia de PCR. O gene montado (reconstituído) pode então ser clonado num vector de expressão para expressão da proteína. A proteína pode então ser analisada quanto às características alteradas.

Por "nuclease" entenda-se um polipéptido, p.ex. uma enzima ou fragmento desta, possuindo actividade nucleolítica. De preferência, a nuclease é uma exonuclease. De maior preferência, a actividade exonucleolítica do polipéptido é maior que a actividade endonucleolítica do polipéptido. De maior preferência, o polipéptido tem actividade exonucleolítica mas é substancialmente livre de actividade endonucleolítica.

Exonucleases adequadas incluem BAL31, exonuclease I, exonuclease V, exonuclease VII, gene 6 da exonuclease de T7, exonuclease do bacteriófago lambda e exonuclease Rec J_f.

De preferência, a primeira e segunda populações de polinucleótidos são digeridas separadamente no passo (b).

Controlando os parâmetros da reacção de digestão com nuclease, o tamanho dos fragmentos polinucleotídicos pode ser controlado. A determinação dos comprimentos dos fragmentos polinucleotídicos evita deste modo a necessidade de ter de proporcionar outro passo tal como a purificação dos fragmentos de comprimento desejado a partir de um gel.

Vantajosamente, pelo menos um parâmetro da reacção utilizada para digestão da primeira população de moléculas polinucleotídicas é diferente do(s) parâmetro(s) equivalente(s) utilizado(s) na reacção para digestão da segunda população de moléculas polinucleotídicas. Por

"parâmetro equivalente" entenda-se o mesmo parâmetro utilizado na reacção para digestão da outra população de moléculas polinucleotídicas de cadeia simples. Parâmetros da reacção adequados que podem ser variados incluem o tipo de nuclease, a concentração da nuclease, o volume reaccional, a duração da reacção de digestão, a temperatura da mistura reaccional, o pH da mistura reaccional, o comprimento das sequências polinucleotídicas originais, a quantidade de moléculas polinucleotídicas originais e a composição do tampão da mistura reaccional.

A utilização de diferentes parâmetros da reacção utilizados para digestão da primeira e segunda populações de moléculas polinucleotídicas proporciona a vantagem de maior variabilidade nos polinucleótidos variantes produzidos através do método do invento.

Assim, uma concretização preferida do primeiro aspecto do invento proporciona um método de combinação de fragmentos polinucleotídicos para gerar sequências polinucleotídicas variantes, compreendendo esse método os passos de:

(a) digestão de um polinucleótido original (de preferência linear) com uma nuclease para gerar uma população de fragmentos de comprimentos variáveis;

(b) montagem de uma sequência polinucleotídica a partir das sequências derivadas do passo (a) em que oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são utilizados para controlar o grau de variabilidade em regiões seleccionadas das sequências polinucleotídicas resultantes.

De preferência o método compreende ainda o passo de (c) expressão da proteína resultante codificada pela sequência polinucleotídica montada e (d) pesquisa da proteína quanto às propriedades ou características alteradas.

O presente invento proporciona também sequências polinucleotídicas obtidas ou obteníveis através do método descrito acima possuindo uma sequência nucleotídica alterada (de preferência codificando um polipéptido possuindo características alteradas/desejadas). Estas sequências polinucleotídicas podem ser utilizadas para gerar vectores de terapia génica e construções de terapia génica de replicação

deficiente ou vectores de vacinação para vacinações baseadas em ADN. Adicionalmente, as sequências polinucleotídicas podem ser utilizadas como ferramentas de investigação.

O presente invento proporciona também uma biblioteca polinucleotídica de sequências geradas através do método descrito acima a partir do qual pode ser seleccionado um polinucleótido que codifica uma proteína possuindo as características alteradas/desejadas. É preferível que a biblioteca polinucleotídica seja uma biblioteca de ADN ou de ADNc.

O presente invento proporciona também proteínas tais como enzimas, anticorpos e receptores possuindo características diferentes às do tipo selvagem produzido através do método descrito acima. Estas proteínas podem ser utilizadas individualmente ou dentro de um transportador farmacologicamente aceitável como vacinas ou medicamentos para terapia, por exemplo, como imunogénios, antigénios ou de outro modo na obtenção de anticorpos específicos. Elas podem também ser utilizadas como ferramentas de investigação.

Para se obter expressão da sequência polinucleotídica gerada, o polinucleótido pode ser incorporado num vector possuindo sequências de controlo operativamente ligadas à sequência polinucleotídica para controlar a sua expressão. Os vectores podem incluir outras sequências tais como promotores ou estimuladores para dirigir a expressão da sequência polinucleotídica inserida, outras sequências polinucleotídicas para que a proteína codificada pelo polinucleótido seja produzida como uma fusão e/ou ácido nucleico codificando sinais de secreção para que a proteína produzida na célula hospedeira seja segregada da célula. A proteína codificada pela sequência polinucleotídica pode então ser obtida através de transformação dos vectores em células hospedeiras nas quais o vector seja funcional, cultura das células hospedeiras para que a proteína seja produzida e recuperação da proteína a partir das células hospedeiras ou do meio circundante. Células procarióticas e eucarióticas são utilizadas para este fim na arte, incluindo estirpes de *E. coli*, levedura e células eucarióticas tais como células COS ou CHO. A escolha da célula hospedeira pode

ser utilizada para controlar as propriedades da proteína expressa nessas células, p.ex. controlando onde a proteína é depositada nas células hospedeiras ou afectando propriedades tais como a sua glicosilação.

A proteína codificada pela sequência polinucleotídica pode ser expressa através de métodos bem conhecidos na arte. Convenientemente, a expressão pode ser alcançada através de crescimento de uma célula hospedeira em cultura, contendo um tal vector, sob condições apropriadas que causem ou permitam a expressão da proteína.

Os sistemas para clonagem e expressão de uma proteína numa variedade de células hospedeiras diferentes são bem conhecidos. Células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células eucarióticas tais como de mamífero e levedura, e sistemas de baculovírus. Também, a utilização do sistema de retrovírus para clonagem e expressão é uma boa alternativa, uma vez que este vírus pode ser utilizado juntamente com vários tipos celulares. As linhas celulares de mamífero disponíveis na arte para expressão de um polipéptido heterólogo incluem células de ovário de hamster chinês, células HeLa, células de rim de hamster bebé, células COS e muitas outras. Um hospedeiro bacteriano comum, preferido é *E. coli*.

Os vectores adequados podem ser escolhidos ou construídos, contendo sequências reguladoras apropriadas, incluindo sequências promotoras, fragmentos terminadores, sequências de poliadenilação, sequências estimuladoras, genes marcadores e outras sequências conforme apropriado. Os vectores podem ser plasmídeos, virais, p.ex. fagos ou fegomídeos, conforme apropriado. Para mais detalhes ver, por exemplo, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 3ª edição, Sambrook and Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muitas técnicas e protocolos conhecidos para manipulação de sequências polinucleotídicas, por exemplo na preparação de construções polinucleotídicas, mutagenese, sequenciação, introdução de ADN em células e expressão génica, e análise de proteínas, são descritos em detalhe em "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

O sistema pode ser utilizado para a criação de bibliotecas de ADN compreendendo sequências variáveis que podem ser pesquisadas quanto à função proteica desejada de vários modos. A função enzimática pode ser pesquisada com métodos específicos para a função real da enzima, p.ex. actividade de CMCase, actividade de β -glucosidase e também termoestabilidade. Além disso, a apresentação fágica e a apresentação à superfície celular podem ser utilizadas para pesquisa da função da enzima (Cramer A. *et al.*, *Nature* 15: 391, 1998 (6664): 288-291; Zhang J. H. *et al.*, *PNAS. USA* 94(9): 4504-4509, 1997; Warren M.S. *et al.*, *Biochemistry*, 9: 35(27), 1996; 8855-8862; Kim *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 788-93, 2000) bem como das propriedades de ligação alteradas de p.ex. anticorpos (Griffith *et al.*, *EMBO J.* 113: 3245-3260, 1994).

Um polipéptido proporcionado pelo presente invento pode ser utilizado na pesquisa de moléculas que afectem ou modulem a sua actividade ou função. Tais moléculas podem ser úteis num contexto terapêutico (possivelmente incluindo profiláctico).

O presente invento proporciona também vectores compreendendo sequências polinucleotídicas geradas através do método descrito acima.

O presente invento proporciona também composições compreendendo sequências polinucleotídicas, vectores compreendendo as sequências polinucleotídicas ou polipéptidos gerados através do método descrito acima e um transportador farmacologicamente aceitável ou um transportador adequado para fins de investigação.

O presente invento proporciona ainda um método compreendendo, após a identificação do polinucleótido ou polipéptido possuindo as características desejadas através do método descrito acima, o fabrico desse polipéptido ou polinucleótido no todo ou em parte, opcionalmente em conjunto com polipéptidos ou polinucleótidos adicionais.

Assim, um outro aspecto do invento proporciona um método para produção de um polipéptido possuindo propriedades alteradas/desejadas, compreendendo o método os seguintes passos:

(a) geração de formas variantes de um polinucleótido original utilizando um método de acordo com o primeiro aspecto do invento;

(b) expressão dos polinucleótidos variantes produzidos no passo (a) para produzir polipéptidos variantes;

(c) pesquisa dos polipéptidos variantes quanto às propriedades desejadas; e

(d) selecção de um polipéptido possuindo propriedades desejadas a partir dos polipéptidos variantes.

O invento proporciona ainda um polipéptido obtido através do método acima.

Após a identificação de um polinucleótido ou polipéptido possuindo características alteradas/desejadas, estes podem então ser fabricados para proporcionar maiores números através de técnicas bem conhecidas tais como PCR, clonagem e expressão dentro de uma célula hospedeira.

Os polipéptidos ou polinucleótidos resultantes podem ser utilizados na preparação de enzimas industriais, p.ex. enzimas de detergentes da roupa onde é desejada maior actividade a temperaturas mais baixas. Alternativamente, o polinucleótido ou polipéptido fabricado pode ser utilizado como ferramenta de investigação, i.e. podem ser utilizados anticorpos em imunoensaios, e os polinucleótidos podem ser utilizados como sondas de hibridação ou iniciadores. Alternativamente, os polipéptidos ou polinucleótidos resultantes podem ser utilizados na preparação de medicamentos para utilização em diagnóstico, utilização farmacêutica, terapia etc. tal como discutido a seguir.

Os polipéptidos ou polinucleótidos gerados através dos métodos do invento e identificados como possuindo características alteradas podem ser formulados em composições farmacêuticas. Estas composições podem compreender, adicionalmente a uma das substâncias acima, um excipiente farmacêuticamente aceitável, transportador, tampão,

estabilizador ou outros materiais bem conhecidos dos peritos na arte. Tais materiais não devem ser tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente activo. A natureza exacta do transportador ou outro material pode depender da via de administração, p.ex. vias oral, intravenosa, cutânea ou subcutânea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.

As composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó ou líquido. Um comprimido pode incluir um transportador sólido tal como gelatina ou um adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas incluem geralmente um transportador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode ser incluída solução salina fisiológica, uma solução de dextrose ou de outro sacarídeo ou glicóis tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, ou injeção no local de aflição, o ingrediente activo estará na forma de uma solução aquosa parentericamente aceitável que seja apirogénica e tenha pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os peritos na arte são perfeitamente capazes de preparar soluções adequadas utilizando, por exemplo, veículos isotónicos tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Ringer Lactada. Conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser incluídos, conforme necessário.

Assim, o invento proporciona ainda um polinucleótido ou polipéptido produzido através dos métodos do invento para utilizar em medicina e a utilização de um polinucleótido ou polipéptido produzido através dos métodos do invento na preparação de um medicamento para utilizar no tratamento, terapia e/ou diagnóstico de uma doença.

Seja um polipéptido, p.ex. um anticorpo ou fragmento deste, uma enzima, um polinucleótido ou molécula de ácido nucleico, identificado após geração através do presente invento a dar a um indivíduo, a administração é de preferência numa "quantidade profilaticamente eficaz" ou numa "quantidade terapêuticamente eficaz" (conforme possa ser o caso, embora a profilaxia possa ser considerada terapia),

sendo esta suficiente para mostrar benefício ao indivíduo. A quantidade real administrada e a taxa e o curso de tempo da administração, dependerão da natureza e gravidade do que está a ser tratado. A prescrição do tratamento, p.ex. decisões sobre a dosagem, etc. está dentro da responsabilidade dos clínicos gerais e outros médicos e tem tipicamente em conta o distúrbio a tratar, a condição de cada paciente, o local de distribuição, o método de administração e outros factores conhecidos dos médicos. Exemplos das técnicas e protocolos mencionados acima podem ser verificados em "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edição, Osol, A. (ed), 1980.

Alternativamente, podem ser utilizadas terapias direccionadas para distribuir o agente activo mais especificamente a certos tipos de células, através da utilização de sistemas direccionadores tais como anticorpos ou ligandos específicos de células. O direccionamento pode ser desejável por uma variedade de razões; por exemplo se o agente for inaceitavelmente tóxico, ou se de outro modo requerer uma dosagem demasiado elevada, ou se de outro modo não for capaz de entrar nas células alvo.

Em vez da administração destes agentes directamente, eles podem ser produzidos nas células alvo através de expressão a partir de um gene codificador introduzido nas células, p.ex. num vector viral (uma variante da técnica VDEPT i.e. o agente activador, p.ex. uma enzima, é produzido num vector através de expressão a partir do ADN codificador num vector viral). O vector pode ser dirigido às células específicas a tratar, ou pode conter elementos reguladores que são ligados mais ou menos selectivamente pelas células alvo.

Alternativamente, o agente pode ser administrado numa forma precursora, para conversão na forma activa através de um agente activador produzido nas, ou dirigido às, células a tratar. Este tipo de abordagem é por vezes conhecido como ADEPT ou VDEPT; o primeiro envolvendo o direccionamento do agente activador para as células através de conjugação com um anticorpo específico das células, enquanto o último envolve a produção do agente activador, p.ex. uma enzima, num vector

através de expressão a partir de ADN codificador num vector viral (ver por exemplo, EP-A-415731 e WO 90/07936).

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, simultaneamente ou sequencialmente dependendo da condição a tratar.

Como outra alternativa, o polinucleótido identificado como possuindo as características desejadas após geração através do método do presente invento pode ser utilizado num método de terapia génica, para tratar um paciente que seja incapaz de sintetizar o polipéptido activo codificado pelo polinucleótido ou incapaz de o sintetizar ao nível normal, proporcionando deste modo o efeito proporcionado pela correspondente proteína de tipo selvagem.

Vectores tais como vectores virais foram utilizados na arte anterior para introduzir polinucleótidos numa ampla variedade de diferentes células alvo. Tipicamente os vectores são expostos às células alvo de modo a que a transfecção possa ocorrer numa proporção suficiente das células para proporcionar um efeito terapêutico ou profilático útil a partir da expressão do polipéptido desejado. O ácido nucleico transfectado pode ser permanentemente incorporado no genoma de cada uma das células tumorais alvejadas, proporcionando um efeito de longa duração ou alternativamente o tratamento pode ter de ser repetido periodicamente.

Uma variedade de vectores, tanto vectores virais como vectores plasmídicos, são conhecidos na arte, ver Patente US No. 5252479 e WO 93/07282. Em particular, vários vírus foram utilizados como vectores de transferência génica, incluindo papovavírus, tais como SV40, vírus vacínia, herpesvírus, incluindo HSV e EBV, e retrovírus. Muitos protocolos de terapia génica na arte anterior utilizavam retrovírus de murídeo desactivados.

Como alternativa à utilização de vectores virais outros métodos conhecidos de introdução de ácidos nucleicos em células incluem electroporação, co-precipitação com fosfato de cálcio, técnicas mecânicas tais como microinjecção,

transferência mediada por lipossomas e tomada directa de ADN e transferência de ADN mediada por receptores.

Tal como mencionado acima, o objectivo da terapia génica utilizando um ácido nucleico codificando um polipéptido, ou uma porção activa deste, é aumentar a quantidade do produto de expressão do ácido nucleico nas células em que o nível de polipéptido de tipo selvagem está ausente ou presente apenas a níveis reduzidos. Tal tratamento pode ser terapêutico no tratamento de células que são já cancerosas ou profilático no tratamento de indivíduos que se saiba através de rastreio terem um alelo de susceptibilidade e assim uma predisposição para, por exemplo, cancro.

O presente invento proporciona também um estojo para geração de uma sequência polinucleotídica ou população de sequências de características desejadas compreendendo reagentes para a preparação de ADNcs, uma exonuclease e componentes para realização de uma técnica de PCR, por exemplo, ADN termoestável (nucleótidos) e um dispositivo de paragem, por exemplo, EGTA.

Tal como delineado acima o presente invento proporciona convenientemente a criação de sequências génicas de enzimas mutadas e a sua combinação aleatória com enzimas funcionais possuindo características desejáveis. Como exemplo deste aspecto do invento, os genes de enzimas são mutados através de PCR propensa a erro que resulta numa taxa de mutação de aproximadamente 0,7%. O banco resultante de genes de enzimas mutadas é então digerido com uma exonuclease, p.ex. BAL31, e a reacção inibida através da adição de EGTA ou através de termoinactivação a diferentes momentos, resultando num conjunto de fragmentos de ADN de diferentes tamanhos. Estes podem então ser sujeitos a remontagem baseada em PCR tal como descrito acima. Os fragmentos de ADN remontados resultantes são então clonados e é construída uma biblioteca génica. Os clones podem então ser seleccionados a partir desta biblioteca e sequenciados.

Outra aplicação desta tecnologia é a geração de uma população de sequências de ADN variáveis que podem ser utilizadas para mais selecções e análises. Além de codificar

proteínas maiores, p.ex. fragmentos de anticorpo e enzimas, o ADN pode codificar péptidos onde as características funcionais das moléculas podem ser utilizadas para o desenho de diferentes sistemas de selecção. A selecção de sequências de ADN recombinadas codificando péptidos foi descrita anteriormente (Fisch *et al.*, *PNAS. USA* 23 Jul 1996; 93(15): 7761-7766). Adicionalmente, a população de ADN variável pode ser utilizada para produzir uma população de moléculas de ARN com p.ex. actividades catalíticas. Vaish *et al.* (*PNAS. USA* 3 Mar 1998; 95(5): 2158-2162) demonstraram o desenho de sistemas funcionais para a selecção de ARN catalítico e Eckstein, F. (*Ciba Found. Symp.*, 209: 207-212, 1997) delineou as aplicações do ARN catalítico através da introdução específica de ARN catalítico em células. O sistema pode ser utilizado para pesquisar ainda através do espaço da sequência na selecção de péptidos/moléculas funcionais com actividades catalíticas baseadas nas sequências de ADN recombinadas.

Os aspectos e as concretizações do presente invento serão agora ilustrados, por meio de exemplo, com referência às figuras acompanhantes. Outros aspectos e concretizações serão aparentes para os peritos na arte.

A Figura 1 mostra os princípios gerais da evolução molecular *in vitro* utilizando a tecnologia FIND™ de Alligator Bioscience (tal como descrito em WO 02/48351).

A Figura 2 mostra uma concretização preferida dos métodos do invento em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são adicionados no passo (b).

A Figura 3 mostra uma concretização preferida dos métodos do invento em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são adicionados no passo (c).

A Figura 4 mostra:

- A. Hibridação de dois ADNcs diferentes de diferente comprimento e polaridade.
- B. Digestão da molécula híbrida com ExoI de 3'→5'.
- C. Digestão da molécula híbrida com ExoVII de 5'→3' e 3'→5'.

A Figura 5 mostra uma imagem de um gel de hibridações de teste:

Pista 1: padrão de ADN de 1 kb (Invitrogen).

Pista 2: Hibridação de CT17 760 pb e CT17 285 pb em Tris 10 mM.

Pista 3: Hibridação de CT17 760 pb e CT17 285 pb em tampão de PCR 1×.

Pista 4: ADNcs CT17 760 pb.

Pista 5: ADNcs CT17 285 pb.

A Figura 6 mostra uma imagem de um gel das digestões com ExoI e ExoVII:

Pista 1: Híbrido CT17 760 pb/CT17 285 não digerido em tampão de ExoI.

Pista 2. Híbrido CT17 760 pb/CT17 285 digerido com ExoI durante 10 minutos.

Pista 3. Híbrido CT17 760 pb/CT17 285 digerido com ExoI durante 20 minutos.

Pista 4: Híbrido CT17 760 pb/CT17 285 não digerido em tampão de ExoVII.

Pista 5. Híbrido CT17 760 pb/CT17 285 digerido com ExoVII durante 20 minutos.

Pista 6. CT17 760 pb/CT17 285 digerido com ExoVII durante 30 minutos.

Pista 7. Padrão da Massa Molecular de Precisão EZload (Bio-RAD).

EXEMPLOS

Os métodos do presente invento são mostrados esquematicamente nas Figuras 1 a 3. Os métodos utilizam a tecnologia FIND™ de Alligator Bioscience, tal como descrito em WO 02/48351 e WO 03/097834, na evolução molecular *in vitro* de uma ou mais sequências polinucleotídicas originais.

Uma descrição detalhada das concretizações exemplares do presente invento é dada abaixo.

Exemplo 1- A tecnologia FIND™

A tecnologia FIND™ é descrita em WO 02/48351 e WO 03/097834.

Reagentes

A polimerase AmpliTaq[®] foi adquirida em Perkin-Elmer Corp., os dNTPs em Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Alemanha), e a Nuclease BAL31 em New England Biolabs Inc. (Beverly, USA). Todas as enzimas de restrição foram adquiridas em New England Biolabs Inc. (Beverly, USA). O brometo de etídio foi adquirido em Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ADN-ligase T4 foi adquirida em New England Biolabs Inc. (Beverly, USA). O EDTA e EGTA foram adquiridos em Kebo Lab (Suécia).

Todos os iniciadores foram desenhados no laboratório e obtidos em Life Technologies (Täby, Suécia) e SGS-DNA (Köping, Suécia).

PCR

Todas as Reacções em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas num termociclador automático (Perkin-Elmer Cetus 480, Norwalk, CT, e USA). As técnicas de PCR para a amplificação de ácido nucleico são descritas em Patente U.S. No. 4683195. As referências para a utilização geral das técnicas de PCR incluem Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263, 1987, Ehrlich (ed), "PCR technology", Stockton Press, NY, 1989, Ehrlich *et al.*, Science, 252: 1643-1650, 1991, "PCR protocols; A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis *et al.*, Academic Press, New York, (1990).

Sequenciação

Todas as construções foram sequenciadas através da utilização do estojo de Sequenciação BigDye Terminator Ciclo Sequencing (Perkin-Elmer, Elmervill, CA, USA). A sequenciação foi efectuada num Sequenciador de ADN ABI Prism 377.

Electroforese em agarose

A electroforese em agarose de ADN foi efectuada com géis de agarose a 2% (AGAROSE (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)) com 0,25 µg/ml de brometo de etídio em tampão Tris-

acetato (tampão TAE 0,04 M Tris-acetato, EDTA 0,001 M). As amostras para electroforese foram misturadas com um tampão de carga esterilizado por filtração composto por Ficoll a 25% e azul Bromfenólico e carregado nos poços num gel de agarose a 2%. A electroforese foi corrida a 90 V durante 45 minutos a menos que afirmado em contrário em tampão Tris-acetato com 0,25 µg/ml de brometo de etídio. As bandas de tamanho apropriado foram purificadas em gel utilizando o Estojo de Extração Qiaquick Gel (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) quando necessário. Como padrão do peso molecular, foi utilizado o padrão de 1 kb de peso molecular de ADN (Gibco BRL). A concentração de ADN dos produtos extraídos do gel foi estimada utilizando um espectrofotómetro.

Estirpes Bacterianas

A estirpe de *Escherichia coli* TOP10F foi utilizada como hospedeiro bacteriano para transformações. Células quimicamente competentes desta estirpe foram produzidas basicamente tal como aqui descrito por Hanahan, D. 1983. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *J. Mol. Biol.* 166: 557-580. Células electrocompetentes desta estirpe bacteriana foram produzidas (Dower, W.J., J.F. Miller & C.W. Ragsdale "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127, 1988).

Plasmídeos

Todas as manipulações genéticas foram efectuadas em pFab5chis tal como descrito em Sambrook, "Molecular cloning; a laboratory manual" (Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). O vector pFab5chis é desenhado para ancorar qualquer gene de scFv inserido entre os locais *SfiI* e *NotI* (ver Emgberg et al., *Methods Mol. Biol.* 51: 355-376, 1995). O local *SfiI* localiza-se no líder pelB e o local *NotI* localiza-se logo após a região VL, tal que é inserido VH-ligador-VL. Neste caso, foi utilizado um anticorpo dirigido a CD40.

Iniciadores

Dois iniciadores biotinilados rodeando o gene do anticorpo de pFab5chis foram desenhados com as seguintes seqüências incluindo locais de restrição únicos designados:
1736 SfiI iniciador directo:

5'-ATT ACT CGC GGC CCA GC▼C GGC CAT GGC CCA CAG GTC AAG
CTC GA

e 1735 NotI iniciador inverso:

5'-TTA GAG CCT GC▼G GCC GCC TTG TCA TCG TCG TCC TT
(em que '▼' designa o local de clivagem)

Os dois iniciadores não biotinilados rodeando o gene do anticorpo de pFab5chis foram desenhados com as seguintes seqüências incluindo locais de restrição designados:

1664 SfiI iniciador directo:

5'-ATT ACT CGC GGC CCA GC▼C GGC CAT GGC CCA CAG GTC AAG
CTC GA

e 1635 NotI iniciador inverso:

5'- TTA GAG CCT GC▼G GCC GCC TTG TCA TCG TCG TCC TT

PCR Padrão

As reacções de PCR padrão foram corridas com 25 ciclos consistindo no seguinte perfil: desnaturação (94°C, 1 minuto), ligação do iniciador (55°C, 1 minuto) e extensão (72°C, 3 minutos). Cada reacção de PCR continha Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, iniciador directo 1 µM, iniciador inverso 1 µM, 1,25 U de ADN-polimerase termoestável AmpliTaq® (Perkin-Elmer Corp.), e 50 ng de molde num volume final de 100 µl.

PCR Propensa a Erro

As reacções de PCR propensa a erro foram realizadas num tampão 10× contendo NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, MgCl₂ 5 mM, 100 µg de gelatina (de acordo com Kuipers *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25 Ago 1991; 19(16): 4558 mas com uma concentração de MgCl₂ aumentada de 2 mM para 5 mM).

Para cada reacção de 100 µl foi misturado o seguinte:

dATP 5 mM	5 µl
dGTP 5 mM	5 µl
dTTP 10 mM	10 µl
dCTP 10 mM	10 µl
Iniciador 3' 20 µM	1,5 µl
Iniciador 5' 20 µM	1,5 µl
Tampão Kuipers 10×	10 µl
H ₂ O mp estéril	46,3 µl

O molde no vector pFab5chis foi adicionado numa quantidade de 50 ng. Foram adicionados 10 µl de MnCl₂ 10 mM e foi verificado que não ocorreu precipitação de MnO₂ no tubo. Foram adicionadas pelo menos 5 Unidades de enzima Taq. A PCR propensa a erro foi corrida às seguintes temperaturas durante 25 ciclos sem um início quente: 94°C 1', 45°C 1', 72°C 1', +72°C durante 7 minutos. O produto resultante foi uma inserção propensa a erro (i.e. mutada) de 750 pb. Esta inserção foi purificada com o estojo de purificação de PCR de Gibco, antes de mais tratamento.

Geração de ADN de cadeia simples através de iniciadores biotinilados

O fragmento de interesse foi amplificado através de duas reacções de PCR separadas. Estas reacções podem ser PCR padrão tal como descrito acima ou PCR propensa a erro também como descrito acima. Os iniciadores devem ser desenhados para que numa reacção o iniciador directo seja biotinilado e na outra reacção seja biotinilado o iniciador inverso. Por exemplo, as reacções de PCR com A) iniciadores 1736 e 1635 e B) iniciadores 1664 e 1735, com o perfil mencionado acima foram efectuadas durante 25 ciclos com pFab5chis-anticorpo como molde. Isto rendeu produtos de PCR de aproximadamente 750 pb: em A a cadeia de cima foi biotinilada; e em B foi biotinilada a cadeia de baixo.

As cadeias não biotiniladas foram recuperadas através de purificação utilizando uma matriz sólida revestida com estreptavidina p.ex. Dynabeads. As contas magnéticas são lavadas e equilibradas com PBS/BSA a 1% e tampão B&W contendo Tris 5 mM pH 7,5, NaCl 1 M, e EGTA 0,5 mM. 100 µl de cada

produto de PCR é misturado com 100 µl de contas dissolvidas em tampão B&W 2× e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos com rotação. Os produtos de PCR não ligados são removidos através de lavagem cuidadosa duas vezes com B&W. A cadeia não biotinilada do ADN capturado é eluída através de desnaturação alcalina deixando o ADN incubado com 25 µl de NaOH 0,1 M durante 10 minutos à temperatura ambiente. A solução é separada das contas e neutralizada com 7,5 µl de HCl 0,33 M e 2,5 µl de Tris 1 M, pH 8.

Geração do ADN de cadeia simples utilizando fagos

O fragmento de interesse foi clonado nos vectores M13mp18 e M13mp19 do bacteriófago M13 utilizando as enzimas de restrição *PstI/HindIII*. O bacteriófago foi propagado utilizando a estirpe de *Escherichia coli* TOP10F' de acordo com métodos convencionais. O ADN de cadeia simples para a cadeia de cima foi preparado a partir do vector bacteriofágico M13mp18 e o ADN de cadeia simples para a cadeia de baixo foi preparado a partir do vector bacteriofágico M13mp19. Resumidamente, 1,5 ml de uma cultura bacteriana infectada foram centrifugados a 12000 g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi precipitado com 200 µl de PEG8000 a 20%/NaCl 2,5 M. O bacteriófago sedimentado foi ressuspensão em 100 µl de TE. Foram adicionados 50 µl de fenol equilibrado com Tris-Cl (pH 8,0) e a amostra foi sujeita a vórtice. Após centrifugação a 12000 g durante 1 minuto à TA a fase superior, contendo o ADN, foi transferido e precipitado com etanol. O sedimento de ADN foi dissolvido em 50 µl de TE (pH 8,0) e armazenado a -20°C. (Sambrook et al. "Molecular Cloning, A laboratory manual" 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, capítulo 4). O ADN de cadeia simples preparado a partir do fago é circular e tem de ser aberto antes do tratamento de BAL31. Isto pode ser efectuado com uma endonuclease capaz de clivar ADN de cadeia simples.

Geração de ADN de cadeia simples utilizando PCR assimétrica

Os produtos de PCR são purificados utilizando uma coluna de centrifugação para remover o excesso de iniciadores a partir da PCR prévia. 150 ng do produto purificado são utilizados como molde numa amplificação linear realizada em

100 µl de tampão de PCR 10× 1×GeneAmp® contendo MgCl₂ 1,5 mM (Applied Biosystems), 200 µM de cada dNTP (New England BioLabs), 1,25 U de ADN-polimerase AmpliTaq® (Applied Biosystems) e 1,0 µM de um único iniciador. As condições do ciclo de PCR são: desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto seguido de extensão a 72°C durante 7 minutos.

Os produtos de PCR assimétricos são separados pelo tamanho a partir do molde de cadeia dupla num gel de agarose a 1% e purificados utilizando o Estorjo de Extração em Gel Qiaquick (Qiagen).

Geração de ADN de cadeia simples utilizando exonuclease de Lambda

Inicialmente é produzido um fragmento de ADNcd utilizando reacções de PCR padrão criando um ADN com locais únicos de enzimas de restrição (ER) na extremidade 5' e 3', respectivamente. A reacção de PCR é dividida em duas e digerida com ER respectivamente para criar uma fosforilação a 5' de preferência com enzimas de restrição criando extremidades 3' de ponta saliente ou cega. A digestão é efectuada em tampão adequado e de um dia para o outro para alcançar uma digestão completa. Se uma enzima criando uma ponta saliente a 5' tiver de ser utilizada, a ponta saliente pode ser preenchida utilizando uma ADN-polimerase. Após purificação são tratados 1-4 µg de ADNcd com 10 U de exonuclease de Lambda (p.ex. Strandase™ de Novagen ou exonuclease de Lambda de NEB) no tampão específico acompanhante durante 30 min a 37°C e a reacção é parada a 75°C durante 10 min. O ADNcs é ainda separado de quaisquer resíduos de ADNcd num gel de agarose utilizando métodos de extração de gel padrão.

Geração de ADN fragmentado de cadeia simples utilizando BAL 31

As cadeias de ADNcs (contendo as cadeias de cima e de baixo, respectivamente) foram sujeitas a tratamento enzimático separado utilizando p.ex. BAL 31 (i.e. as cadeias

de cima foram digeridas separadamente das cadeias de baixo). Cada reacção de digestão continha 0,02 µg/µl de ADNcs, NaCl 600 mM, Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 12 mM, MgCl₂ 12 mM, EDTA 1 mM pH 8,0 e BAL 31 a várias concentrações de enzima variando de 0,1-5 U/ml. As reacções foram incubadas a 30°C e as fracções de ADNcs digerido foram colhidas sequencialmente a 10, 30, 60 e 120 segundos ou mais. As reacções foram paradas através da adição de EDTA e tratamento térmico a 65°C durante 10 minutos. Os fragmentos de ADNcs foram purificados através de extracção com fenol/clorofórmio e precipitados em etanol. Os ADNcs são ressuspensos em Tris 10 mM, pH 8,0.

O padrão de digestão foi avaliado através de electroforese em gel de agarose a 1%.

Purificação dos fragmentos produzidos por digestão:

Os fragmentos de ADN digeridos foram purificados através de extracção com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. 50 µl de fenol tamponado foram adicionados a cada tubo de 100 µl de amostra juntamente com 50 µl de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram sujeitos a vórtice durante 30 segundos e depois centrifugados durante 1 minuto numa microcentrífuga a 14000 rpm. A fase superior foi então colhida e misturada com 2,5 volumes de etanol a 99,5% (1/10 era Acetato de Sódio 3 M, pH 5,2). O ADN foi precipitado durante 1 hora a -80°C. O ADN foi então sedimentado através de centrifugação durante 30 minutos numa microcentrífuga a 14000 rpm. O sedimento foi lavado uma vez com etanol a 70% e depois novamente dissolvido em 10 µl de água estéril.

Análise dos fragmentos purificados produzidos por digestão em gel de agarose

Foram misturados 5 µl do sedimento dissolvido de cada momento e do branco com 2,5 µl de tampão de carga (Ficoll a 25% e azul Bromfenólico) e carregados nos poços de um gel de agarose a 2%. A electroforese dos diferentes momentos foi efectuada tal como acima.

Remontagem dos fragmentos inteiros

A remontagem dos fragmentos de ADNcs é alcançada através de duas reacções sequenciais de PCR. A primeira reacção de PCR deve conter Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 0,3 U de polimerase Taq e 2 µl de amostra tratada com BAL31, tudo num volume final de 25 µl, e sujeita a 5 ciclos com o seguinte perfil: 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos + 72°C durante 5 minutos. A segunda reacção de PCR deve conter Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 0,6 U de polimerase Taq, iniciador directo 1 µM, iniciador inverso 1 µM, e 5 µl de amostra da primeira reacção de PCR, tudo num volume final de 50 µl, e sujeito a 15 ciclos com o seguinte perfil: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos + 72°C durante 7 minutos.

Os produtos resultantes podem ser avaliados através de electroforese em gel de agarose.

Digestão de restrição do fragmento remontado e do plasmídeo com SfiI e NotI

O fragmento remontado e o plasmídeo pFab5chis foram clivados primeiro com SfiI através da utilização de tampão NEB 2 incluindo BSA e 11 U de enzima/µg de ADN. A reacção foi realizada durante 4 h a 50°C. Após isto o ADN foi clivado com NotI através da adição de tampão de conversão e 6 U de enzima/µg de ADN. Esta reacção foi realizada de um dia para o outro a 37°C.

Purificação em gel do vector digerido por restrição e do fragmento remontado digerido por restrição

As reacções de clivagem foram analisadas num gel de agarose a 1%. A inserção digerida por restrição mostrou um produto de clivagem de cerca de 750 pb. Isto corresponde bem ao tamanho esperado. A banda da inserção clivada e do plasmídeo foi cortada e extraída em gel tal como anteriormente descrito.

Ligação do fragmento digerido por restrição remontado com pFab5chis digerido por restrição

pFab5chis clivado purificado foi ligado ao fragmento remontado purificado digerido por restrição num banho-maria a 12°C durante 16 horas. 50 µl do vector foram misturados com 50 µl da inserção e 15 µl de tampão 10× (fornecido com a enzima), 7,5 µl de ligase (5 U/µl) e água estéril até um volume final de 150 µl. Uma ligação de pFab5chis digerido por restrição sem qualquer inserção foi também efectuada do mesmo modo.

Transformação de E. coli TOP10F' quimicamente competente com a inserção remontada ligada e pFab5chis

As reacções de ligação foram purificadas através de extracção com fenol/clorofórmio tal como descrito acima. A fase superior da extracção foi colhida e misturada com 2,5 volumes de etanol a 99,5% (1/10 era Acetato de Sódio 3 M, pH 5,2). O ADN foi precipitado durante 1 hora a -80°C. O ADN foi então sedimentado através de centrifugação durante 30 minutos numa microcentrífuga a 14000 rpm. O sedimento foi lavado uma vez com etanol a 70% e depois re-dissolvido em 10 µl de água estéril. 5 µl de cada ligação foram separadamente misturados com 95 µl de *E. coli* TOP10F' quimicamente competente incubadas em gelo durante 1 hora e depois transformadas (Sambrook *et al.* "Molecular Cloning, A laboratory manual" 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Após uma hora de crescimento as bactérias das duas transformações foram espalhadas em placas de agar contendo ampicilina (100 µg/ml). As placas foram criadas voltadas para baixo numa incubadora a 37°C durante 14 horas.

Exemplo 2 - Controlo de variabilidade utilizando oligonucleótidos de variabilidade predeterminada I

Introdução

A fundamentação lógica para este conjunto de experiências foi que em muitos casos haveria um interesse em mutar especificamente uma área de interesse tal como em regiões CDR de um anticorpo e mantendo a estrutura inalterada

ou adicionar regiões não mutadas tais como um local activo de uma enzima inibindo eventos de recombinação nesta área.

Os genes de teste utilizados foram A2.30 e A2.54 (Ellmark *et al. Molecular Immunology* 39: 349-356, 2002), dois clones de scFv com especificidade para CD40.

Materiais e Métodos

Produção de oligonucleótidos de variabilidade predeterminada

Os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada, correspondendo a formas mutadas de CDR2 de A2.30, foram produzidos como se segue.

Dois ciclos sequenciais de PCR com condições Propensas a Erro (ver Tabela 1a e 1b) foram efectuados no clone A2.30 utilizando os iniciadores #137 e #138 (ver Tabela 1c) criando produtos de PCR mutados cobrindo do pb 56 ao pb 352 do A2.30. Uma terceira PCR com condições Propensas a Erro foi efectuada utilizando os iniciadores #351 e #357* ou #354* e #350 (* indicando uma marcação de biotina a 5') criando fragmentos de CDR2 cobrindo a sequência interna do pb 104 ao pb 221 do clone A2.30. Estes produtos de PCR foram ainda mutados utilizando o Estoque de Mutagénese por PCR Gene Morph™ (Stratagene) utilizando os mesmos iniciadores. ADNcs foi purificado a partir dos produtos de PCR biotinilados utilizando o estoque de Estreptavidina µMACS (Miltenyi Biotec) e foi feita mais purificação em géis de agarose onde o ADNcs foi recuperado utilizando Recochips (TaKaRa). O ADNcs foi precipitado com NaAc/etanol e depois re-dissolvido em Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

Tabela 1(a)

<i>Reagente (produtor)</i>	<i>Concentração final</i>
Tampão de PCR Gold Geneamp 10× (Applied Biosystems)	1×
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	7 mM
gelatina a 0,1% (p/v) (Sigma)	0,01%
dATP 5 mM (New England Biolabs)	0,2 mM
dGTP 5 mM (New England Biolabs)	0,2 mM
dTTP 10 mM (New England Biolabs)	1 mM
dCTP 10 mM (New England Biolabs)	1 mM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	300 nM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	300 nM
MnCl ₂ 5 mM (Merck)	0,5 mM
AmpliTaQ Gold a 5 U/μl (Applied Biosystems)	0,025 U/μl
ADN	4 ng ou 4 μl de produto de PCR

Tabela 1(b)

<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
1	94°C	7 min
30	94°C	30 seg
	45°C	30 seg
	72°C	30 seg
1	72°C	7 min

Tabela 1(c)

<i># do Iniciador</i>	<i>Sequência</i>
137	CGC GAA TTG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG
138	AGA TGG GGG ACT AGT GCT GCT CAC GGT GAC
350	CCTGGAGCCTGGCGGACCCA
351	GCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
354*	BIO-GACTCTCCTGTGCAGCCTCT
357*	BIO-TTGTCTCTGGAGATGGTGAA
226	CTCACTATAGGGCGAATTGG
415	TTCAGATCTCGAGGTGCAGCTGTTGGAG
224	CCTATTGCCTACGGCAGCC
332*	BIO-CCTATTGCCTACGGCAGCC
333*	BIO-CTCACTATAGGGCGAATTGG

*Produção de polinucleótidos originais de cadeia simples
(Passo "a")*

Uma reacção de PCR padrão (Tabela 2a e 2b) foi feita nos clones A2.30 e A2.54 com os iniciadores #224 e #333* ou #332* e #226 (* indicando uma marcação de biotina a 5'). O ADNcs, que serviu como polinucleótido original, foi purificado tal como descrito acima.

*Digestão dos polinucleótidos de cadeia simples originais
(Passo "b")*

Os tratamentos com exonuclease foram efectuados nas cadeias com sentido e anti-sentido tal como mostrado na Tabela 3 em sistemas tampão indicados pelo produtor.

Tabela 2a

<i>Reagente (produtor)</i>	<i>Concentração final</i>
Tampão de PCR Gold Geneamp 10× (Applied Biosystems)	1×
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	3 mM
dNTP 10 mM (New England Biolabs)	0,2 mM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	500 nM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	500 nM
AmpliTaq Gold a 5 U/μl (Applied Biosystems)	0,025 U/μL
ADN	4 ng

Tabela 2 (b)

<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
1	94°C	7 min
30	94°C	30 seg
	58°C	30 seg
	72°C	60 seg
1	72°C	7 min

Tabela 3

<i>Exonuclease (produtor)</i>	<i>Quantidade de enzima/μg de ADNcs</i>	<i>Tempo</i>
ExoI (New England Biolabs)	100 U/μg	10 min
ExoV (USB)	25 U/μg	30 min
ExoVII (USB)	5 U/μg	30 min

Geração de polinucleótidos variantes (Passos "c" e "d")

A remontagem foi alcançada em dois estádios. Na primeira reacção de remontagem (PCR1, Tabela 4a e 4b) 7,5 ng de ADNcs com sentido e anti-sentido fragmentado com exonuclease de A2-30 e A2-54, respectivamente, foram misturados com 5 ng de fragmentos com sentido de CDR2 (o último constituindo oligonucleótidos de variabilidade predeterminada; ver acima). Após 25 ciclos de PCR1 toda a mistura reaccional foi adicionada a uma segunda reacção de PCR para amplificação, em

que os iniciadores foram adicionados para permitir a formação de polinucleótidos inteiros (PCR2 Tabela 4a e 4b).

Os produtos de PCR resultantes foram ligados num Sistema Vector pGEM-T (Promega) e sequenciados.

Tabela 4 (a)

Reagente (produtor)	Concentração final PCR1	Concentração final PCR2
Tampão de PCR Gold Geneamp 10× (Applied Biosystems)	1×	1×
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	1,5 mM	1,5 mM
dNTP 1,25 mM (New England Biolabs)	0,2 mM	0,2 mM
Iniciador oligonucleotídico #415 20 μM	-	1 mM
Iniciador oligonucleotídico #226 de 20 CM	-	1 mM
AmpliTaq Gold a 5 U/μl (Applied Biosystems)	0,01215 U/μl	0,025 U/μL
ADN	35 ng (ver texto)	todo da PCR1

Tabela 4 (b)

PCR1			PCR2		
Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	7 min	1	95°C	7 min
25	94°C	30 seg	30	94°C	30 seg
	50°C	45 seg		58°C	45 seg
	72°C	60 seg		72°C	120 seg
1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

Resultados e conclusões

Vinte clones produzidos tal descrito acima, utilizando o método do invento, foram sequenciados e analisados para mutações em comparação com A.2-30 e A.2-54.

A frequência global de mutações foi de 1 mutação/1000 pb, que corresponde a uma frequência normal de mutação com amplificação por PCR padrão (i.e. PCR não propensa a erro).

No entanto, sete dos vinte clones (35%) tinham uma ou duas mutações na região interna de CDR2 de 78 pb. Esta está claramente acima da probabilidade apenas para as mutações induzidas por PCR e pode portanto ser explicada como induzida pela adição no passo (c) dos oligonucleótidos de CDR2 pré-mutados (i.e. os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada). Todos os clones com mutações na região de CDR2 mostraram recombinações entre os dois clones iniciais, A2.30 e A2.54. O número de recombinações nestes clones variou de um a quatro. A frequência global de recombinação da biblioteca foi de 1,4 recombinações por sequência.

Em conclusão, esta experiência demonstra que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada podem ser utilizados para aumentar selectivamente a variabilidade dentro de uma região seleccionada (CDR2) de um polinucleótido original codificando uma molécula scFv.

Exemplo 3 - Controlo da variabilidade utilizando oligonucleótidos de variabilidade predeterminada II

Introdução

A seguinte experiência foi também efectuada utilizando os clones de scFv A2.30 e A2.54.

Materiais e Métodos

Produção de oligonucleótidos de variabilidade predeterminada

Os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada, correspondendo aos fragmentos de ADNcs mutados de CDR1, CDR2, CDR3 e CDR1+2, foram produzidos como se segue.

Dois ciclos sequenciais de PCR com condições Propensas a Erro (Tabela 5a e 5b) foram efectuados no clone A2.30 utilizando os iniciadores #137 e #138 (ver Tabela 5c) criando produtos de PCR mutados cobrindo do pb 56 ao pb 352 do A2.30. Uma terceira PCR com condições Propensas a Erro foi efectuada utilizando iniciadores criando os fragmentos mostrados na Tabela 6. Estes produtos de PCR foram ainda mutados utilizando o Estojo de Mutagénesse por PCR Gene Morph™

(Stratagene) utilizando os mesmos iniciadores que acima e indicados na Tabela 6.

Após ligação num Sistema Vector pGEM-T (Promega) e sequenciação, a frequência da mutação, em comparação com A2-30, foi calculada tal como é mostrado na tabela 7.

Tabela 5(a)

<i>Reagente (produtor)</i>	<i>Concentração final</i>
Tampão de PCR Gold Geneamp 10× (Applied Biosystems)	1×
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	7 mM
Gelatina a 0,1% (p/v) (Sigma)	0,01%
dATP 5 mM (New England Biolabs)	0,2 mM
dGTP 5 mM (New England Biolabs)	0,2 mM
dTTP 10 mM (New England Biolabs)	1 mM
dCTP 10 mM (New England Biolabs)	1 mM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	300 nM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	300 nM
MnCl ₂ 5 mM (Merck)	0,5 mM
AmpliTaq Gold a 5 U/μl (Applied Biosystems)	0,025 U/μL
ADN	4 ng ou 4 μL de produto de PCR

Tabela 5(b)

<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
1	94°C	7 min
30	94°C	30 sec
	45°C	30 sec
	72°C	30 sec
1	72°C	7 min

Tabela 5 (c)

<i># do Iniciador</i>	<i>Sequência</i>
137	CGC GAA TTG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG
138	AGA TGG GGG ACT AGT GCT GCT CAC GGT GAC
349	GACTCTCCTGTGCAGCCTCT
350	CCTGGAGCCTGGCGGACCCA
351	GCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
352	TTGTCTCTGGAGATGGTGAA
354*	BIO-GACTCTCCTGTGCAGCCTCT
355*	BIO-CCTGGAGCCTGGCGGACCCA
356*	BIO-GCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
357*	BIO-TTGTCTCTGGAGATGGTGAA
226	CTCACTATAGGGCGAATTGG
415	TTCAGATCTCGAGGTGCAGCTGTTGGAG
224	CCTATTGCCTACGGCAGCC
332*	BIO-CCTATTGCCTACGGCAGCC
333*	BIO-CTCACTATAGGGCGAATTGG
384	CACTGCCGTGTATTACTGT
386*	BIO-CAGTGTACCTTGGCCCCA

Tabela 6

<i>Fragmento mutado</i>	<i>Posição no gene modelo incluindo iniciadores (pb)</i>	<i># do Iniciador utilizado para purificar cadeias com sentido</i>		<i># do Iniciador utilizado para purificar cadeias anti-sentido</i>	
CDR1	56-125	349	355*	354*	350
CDR2	104-221	351	357*	356*	352
CDR3	270-352	384	386*		

* indicando marcação do oligonucleótido com biotina a 5'

Tabela 7

<i>Fragmento</i>	<i>Frequência de mutação</i>
CDR1	2,7/100 pb
CDR2	0,7/100 pb
CDR3	

A partir dos produtos de PCR biotinilados indicados na tabela 6, ADNcs foi purificado utilizando o estojo de Estreptavidina μ MACS (Miltenyi Biotec). Foram realizadas mais purificações em géis de agarose, das quais foi recuperado o ADNcs utilizando Recochips (TaKaRa).

O ADNcs, que serviu como oligonucleótido de variabilidade predeterminada na seguinte experiência, foi precipitado com NaAc/etanol e depois re-dissolvido em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

Produção de polinucleótidos originais (Passo "a")

Uma reacção de PCR padrão (Tabela 8) foi feita em A2.30 e A2.54 com os iniciadores indicados (Tabela 9). O ADNcs, que serviu como polinucleótido original, foi purificado tal como descrito acima.

Digestão de polinucleótidos originais de cadeia simples (Passo "b")

Os tratamentos com exonuclease foram efectuados nas cadeias com sentido e anti-sentido separadas tal como mostrado na Tabela 10.

Tabela 8

<i>Reagente (produtor)</i>	<i>Concentração final</i>
Tampão de PCR Gold Geneamp 10× (Applied Biosystems)	1×
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	3 mM
dNTP 10 mM (New England Biolabs)	0,2 mM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	500 nM
Iniciador oligonucleotídico 20 μM	500 nM
AmpliTaq Gold a 5 U/μl (Applied Biosystems)	0,025 U/μL
ADN	4 ng

Tabela 9

ADN	<i>Iniciadores utilizados para purificar cadeias com sentido</i>		<i>Iniciadores utilizados para purificar cadeias anti-sentido</i>	
A2.30	224	333*	332*	226
A2.54	224	333*	332*	226

* indicando marcação do oligonucleótido com biotina a 5'

Tabela 10

<i>Exonuclease</i>	<i>Quantidade de enzima/μg de ADNcs</i>	<i>Tempo</i>
ExoI	100 U/μg	10 min
ExoV	25 U/μg	30 min
ExoVII	5 U/μg	30 min

Geração de polinucleótidos variantes (Passos "c" e "d")

Foi feito um conjunto de bibliotecas. A remontagem das PCR foi feita em dois passos. No primeiro, PCR1, ADNcs com sentido e anti-sentido fragmentado com exonuclease de A2-30 e A2-54, respectivamente, foi misturado com oligonucleótidos correspondendo a formas mutadas de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 ("oligonucleótidos de variabilidade predeterminada"), tal como indicado na Tabela 11a e 13b.

Após 25 ciclos de PCR1 (Tabela 12a e 12b) toda a mistura reaccional foi adicionada a uma segunda reacção (PCR2; Tabela

12a e 12b), que também continha os iniciadores específicos terminais, e corrida durante 20 ciclos. Os produtos de PCR foram ligados num Sistema Vector pGEM-T (Promega) e sequenciados.

Tabela 11(a)

<i>Biblioteca</i>	<i>ng de A2.30 tratado com exonuclease sentido/anti-sentido</i>	<i>ng de A2.54 tratado com exonuclease sentido/anti-sentido</i>	<i>ng de fragmento de CDR1 mutado sentido/anti-sentido</i>	<i>ng de fragmento de CDR2 mutado sentido/anti-sentido</i>
A	7,5/7,5	7,5/7,5	0,75/0,75	-
B	7,5/7,5	7,5/7,5	-	1,25/1,25
C	7,5/7,5	7,5/7,5	-	1,25/-
D	7,5/7,5	7,5/7,5	-	2,5/-
E	7,5/7,5	7,5/7,5	-	5/-

Tabela 11(b)

<i>Biblioteca</i>	<i>ng de A2.30 tratado com exonuclease sentido/anti-sentido</i>	<i>ng de A2.54 tratado com exonuclease sentido/anti-sentido</i>	<i>ng de fragmentos com sentido de CDR1/CDR2/CDR3 mutados</i>
F	30/30	30/30	3/5/3,6
G	30/30	30/30	3/5/3,6

Tabela 12(a)

<i>Reagente (produtor)</i>	<i>Concentração final PCR1</i>	<i>Concentração final PCR2</i>
Tampão de PCR Gold Geneamp 10× (Applied Biosystems)	1×	1×
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	1,5 mM	1,5 mM
dNTP 1,25 mM (New England Biolabs)	0,2 mM	0,2 mM
Iniciador oligonucleotídico #415 20 µM	-	1 mM
Iniciador oligonucleotídico #226 20 µM	-	1 mM
AmpliTaq Gold a 5 U/µl (Applied Biosystems)	0,01215 U/µl	0,025 U/µl
ADN	Ver tabela 13a e 13b	tudo da PCR1

Tabela 12(b)

<i>PCR1</i>			<i>PCR2</i>		
<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
1	95°C	7 min	1	95°C	7 min
25	94°C	30 sec	30	94°C	30 sec
	50°C	45 sec		58°C	45 sec
	72°C	60 sec		72°C	120 sec
1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

Resultados e conclusões

A frequência global de mutação foi de 1 mutação/1000 pb, que corresponde a uma frequência normal de mutação com amplificação por PCR padrão (i.e. PCR não propensa a erro).

Entre 11% e 56% dos clones nas diferentes bibliotecas mostraram mutações nas suas regiões CDR correspondendo aos oligonucleótidos de variabilidade predeterminada adicionados (Tabela 13). Os trechos mutados tinham 30 pb, 78 pb e 46 pb para CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente. A incidência de mutação nestas áreas após adição dos fragmentos de CDR foi claramente acima da probabilidade de apenas mutações

induzidas por PCR e pode ser portanto apenas explicada através da adição dos oligonucleótidos pré-mutados.

Tabela 13

<i>Biblioteca (clones analizados)</i>	<i>Sequências mutadas nas regiões CDR1/CDR2/ CDR3</i>	<i>Clones com mutação de CDR</i>	<i>Frequência de mutação no gene (região ou regiões de CDR) mutações/ 1000 pb</i>	<i>Recombinações globais/ sequência</i>
A (19)	2/na/na	11%	0,71	1,9
B (18)	na/6/na	33%	0,86	2,4
C (16)	na/3/na	19%	0,90	2,6
D (18)	na/2/na	11%	0,84	2,2
E (20)	na/7/na	35%	1,13	1,3
F (16)	4/2/4 [^]	56%	0,79	2,6
G (20)	2/3/3 ["]	35%	0,85	2,1

na = não aplicável

[^] um clone com ambas as mutações CDR2 e CDR3

["] um clone com ambas as mutações CDR1 e CDR3

Em conclusão, esta experiência demonstra que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada podem ser utilizados para aumentar selectivamente a variabilidade dentro de múltiplas regiões seleccionadas (CDR1, CDR2 e CDR3) de um polinucleótido original codificando uma molécula scFv.

Exemplo 4 - Controlo da variabilidade utilizando oligonucleótidos de variabilidade predeterminada III

Introdução

As seguintes experiências foram efectuadas para demonstrar a protecção de uma região/regiões de uma sequência nucleotídica a partir da degradação com exonucleases. A fundamentação lógica foi ser capaz de proteger regiões num gene a partir de recombinação numa reacção FIND™ mantendo a sequência original nestas regiões não digeridas por exonucleases. Na seguinte reacção FIND™ estas regiões não digeridas são sempre do tipo original e assim não recombinadas.

Desenho experimental

Foram efectuadas duas PCR separadas, com um iniciador biotinilado e um iniciador não modificado, para criar dois produtos de PCR diferentes utilizados como moldes para preparação de ADNcs (ver Tabela 14 e 15). Após a preparação do ADNcs, os dois ADNcs resultantes de diferentes tamanhos e polaridades foram hibridados. A molécula híbrida resultante foi então tratada com Exonuclease I e Exonuclease VII, respectivamente, e os produtos de digestão corridos num gel de agarose para avaliar os resultados da experiência (ver Figura 4).

Tabela 14

Iniciadores utilizados para produzir os produtos e polaridade do ADNcs correspondente

<i>Produto de PCR</i>	<i>Comprimento</i>	<i>Iniciador 1</i>	<i>Iniciador 2</i>	<i>Polaridade do ADNcs</i>
CT17 760 pb	760 pb	127_5'VH	49_3'smuc159- biotina	Com sentido
CT17 285 pb	285 pb	149_5'CDR3VH- biotina	145_3'CDR1VL	Anti- sentido

Tabela 15

Sequências iniciadoras

<i>Nome do iniciador</i>	<i>Sequência iniciadora</i>
127_5'VH	5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCT
49_3'smuc159-biotina	5'Biotina-CAGCTTGGTTCCTCCGCCGAA
149_5'CDR3VH-biotina	5'Biotina-CGTGTATTACTGTGCGAGAGT
145_3'CDR1VL	5'TCCTGGGAGCTGCTGATACCA

Materiais e métodos**Tabela 16***Amplificação por PCR de CT17 760 pb*

(a)

	μl	20.5	C	Final
Aq	63,75	1307		
dNTP	16	328	1,25 mM	0,1995
Tampão 10×	10	205	10×	0,99751
Iniciador 1	5	102,5	20	0,99751
Iniciador 2	5	102,5	20 μM	0,99751
ADN-polimerase	0,25	5,125	5 U/ μl	0,012
DNA	0,25		666,5 ng/ μl	1,662
Volume total	100,25	2055		

(b)

	ADN	Iniciador 1	Iniciador 2
1-20	CT17/pFAB5C	127_5'VH	49_3'smuc159-Biotina
21	Controlo negativo		

(c)

Programa de PCR:

35×	94°C	30 seg
	55°C	30 seg
	72°C	1 min

ADN-polimerase Amplitaq (5 U/ μl), Applied Biosystems

Os produtos de PCR são purificados com o sistema de purificação por PCR JetQuick (Genomed). Rendimento total: 52,5 μg , conc.: 132,6 ng/ μl

Tabela 17*Amplificação por PCR de CT17 285 pb*

(a)

	μl	20.5	C	Final
Aq	63,5	1333,5		
dNTP	16	336	1,25 mM	0,2
Tampão 10×	10	210	10×	1
Iniciador 1	5	105	20	1
Iniciador 2	5	105	20 μM	1
ADN-polimerase	0,25	5,25	5 U/ μl	0,013
DNA	0,25		666,5 ng/ μl	1,666
Volume total	100	2100		

(b)

	ADN	Iniciador 1	Iniciador 2
1-20	CT17/pFAB5C	145_3'CDR1VL	149_5'CDR3VH-biotina
21	Controlo negativo		

(c)

Programa de PCR:

1×	94°C	2 min
35×	94°C	1 min
	55°C	30 sec
	72°C	1 min
1×	72°C	7 min

ADN-polimerase Amplitaq (5 U/ μl), Applied Biosystems

Os produtos de PCR são purificados com o sistema de purificação de PCR JetQuick (Genomed).

Tabela 18*Preparação de ADNcs de CT17 760 pb e CT17 285 pb*

Preparação de ADNcs com o estojo de Estreptavidina μ MACS (Miltenyi Biotec, GTF)

Amostra	ADNcd	Conc. (ng/ μ l)	Comprimento (pb)	Número de pb \times 0,066* de ADNcd	Quantidade de ADNcd (μ g)	Volume de ADNcd (μ l)	Volume contas \times 5** (μ l)
1	CT17 760 pb	132,6	760	50,16	52,1	394	150
2	CT17 285 pb	52,8	285	18,81	21,1	400	450

* 100 μ l de contas ligam-se a X μ g de ADN (X = número de pb \times 0,066). ** As contas são adicionadas num excesso de 5 \times .

- A coluna foi equilibrada com "tampão de equilíbrio para aplicações de ácido nucleico" e deixou-se subsequentemente 2 \times 100 μ l de B&W 1 \times (Tris 5 mM, pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 1 M) correr através da coluna.

- O ADNcd foi misturado com contas e aplicado.

- A coluna foi lavada 4 vezes com 100 μ l de B&W 1 \times e o ADNcs foi eluído com 150 μ l de NaOH 0,1 M (armazenado a -20°C, descongelado de fresco) após o que foram adicionados ao eluato 45 μ l de HCl 0,33 M e 15 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 para neutralizar o ADNcs.

Purificação do ADNcs a partir do gel com Recochip (TaKaRa)

65 μ l de ADNcs/poço foram corridos durante 60 min a 100 V num gel de agarose a 1%/TAE 1 \times . Recochip foi inserido e corrido durante 10 + 2 min a 100 V com polaridade inversa. O teor de ADN no recochip foi verificado através de UV. O recochip foi removido para um tubo (proporcionado) e o tubo foi centrifugado durante 5 seg a 5000 rpm. Após serem precipitados com 2,5 vol. de EtOH a 95% e 0,1 vol. de NaAc 3

M, pH 4,6, CT17 760 e CT17 285 foram dissolvidos em 50 μ l e 35 μ l de Tris 10 mM, pH 8,0, respectivamente.

Tabela 19

Teste de hibridação em Tris 10 mM ou tampão de PCR. p64, 15-HeT

CT17 760 pb:CT17 285 pb são hibridados numa razão molar de 1:2

<i>1. Tris 10 mM</i>	<i>Volume</i>	<i>2. Tampão de PCR</i>	<i>Volume</i>
75 ng de CT17 760 pb	1,46 μ l	75 ng de CT17 760 pb	1,46 μ l
75 ng de CT17 760 pb	1,46 μ l	75 ng de CT17 760 pb	1,46 μ l
58 ng de CT17 285 pb	0,8 μ l	58 ng de CT17 285 pb	0,8 μ l
Tris 10 mM, pH 8,0	7,74 μ l	Tampão de PCR 10 \times	1,0 μ l
		H ₂ O	6,74 μ l
Volume total	10,0 μ l	Volume total	10,0 μ l

As amostras foram hibridadas numa máquina de PCR a 95°C durante 5 minutos, seguido de um passo de heteroduplex, consistido em 45 ciclos de 1 minuto cada onde a temperatura é abaixada em 1°C durante cada ciclo após o que as amostras foram corridas num gel de agarose a 1,5%.

Tabela 20

Hibridação em tampão de PCR

CT17 760 pb e CT17 285 pb foram hibridados numa razão molar de 1:2.

<i>1.</i>	<i>Volume</i>
1 μ g de CT17 760 pb	19,5 μ l
0,769 μ g de CT17 285 pb	10,6 μ l
Tampão de PCR 10 \times	4,0 μ l
H ₂ O	5,9 μ l
Volume total	40 μ l

A concentração final de ADN na amostra foi de 44 ng/ μ l.

A amostra foi hibridada numa máquina de PCR a 95°C durante 5 minutos, seguido de um passo de heteroduplex, consistindo em 45 ciclos de 1 minuto cada onde a temperatura é abaixada em 1°C durante cada ciclo. A precipitação foi efectuada tal como descrito acima e o sedimento dissolvido em 40 µl de Tris 10 mM, pH 8.

Fragmentação de CT17 760 pb-CT17 285 pb hibridados com Exo I

Tabela 21

	1	2
ADN	Hibr. CT17 760 pb/285 pb	Hibr. CT17 760 pb/285 pb
Concentração (ng/µl)	44	44
Quantidade utilizada (ng)	748	60

Tabela 22

	1	2
H ₂ O	10,76 µl	3,1 µl
Tampão de ExoI 10× (NEB)	3,5 µl	0,5 µl
ExoI (NEB) a 10 U/µl	3,74 µl	-
ADNcs	17,0 µl	1,4 µl
<i>Total</i>	35 µl	5 µl

A ExoI e o ADN hibridado foram adicionados à mistura água/tampão pré-aquecida a 37°C. Para a amostra 1, foram removidos 17,5 µl a 10 min e 15 min, respectivamente, e termo-inactivados durante 10 minutos a 96°C. Para a amostra 2, foi removido e termo-inactivado o volume inteiro durante 10 minutos a 96°C após 15 min. Toda a reacção de controlo (60 ng) e 2,8 µl (60 ng) de 10 min e 15 min foram corridas num gel de agarose a 1,2%.

Fragmentação de CT17 760 pb-CT17 285 pb hibridado com Exo VII

Tabela 23

	1	2
ADN	Hibr. CT17 760 pb/285 pb	Hibr. CT17 760 pb/285 pb
Concentração (ng/ μ l)	44	44
Quantidade utilizada (ng)	748	60

ExoVIIConcentração: 10 U/ μ lDiluição: 2 U/ μ l

Produzida por: USB

Número do lote: 108705-005

Tabela 24

	1	2
H ₂ O	12,6 μ l	3,1 μ l
Tampão de ExoI 10 \times *	3,5 μ l	0,5 μ l
ExoI	1,87 μ l	-
ADNcs	17,0 μ l	1,4 μ l
<i>Total</i>	35 μ l	5 μ l

* Tampão de Exo VII 10 \times : Tris-HCl 500 mM, pH 7,9, Fosfato de potássio 500 mM, pH 7,6, EDTA 83 mM, B-Mercaptoetanol 100 mM

- A H₂O e o tampão foram pré-aquecidos durante 10 min a 37°C.

- É adicionada ExoVII.

- É adicionado o ADN hibridado.

- Para a amostra 1, foram tomados 17,5 μ l a 20 min e 30 min, respectivamente, e termo-inactivados durante 10 minutos a 96°C.

- Para a amostra 2, todo o volume é tomado a 30 min e termo-inactivado durante 10 minutos a 96°C.

- Toda a reacção de controlo (60 ng) e 2,8 μ l (60 ng) de 20 min e 30 min são corridos num gel de agarose a 1,2%.

Resultados

Preparação do ADNcs

Foram feitas duas reacções de PCR separadas para produzir os seguintes produtos de PCR: CT17 760 pb (biotinilado a 3') e CT17 285 pb (biotinilado a 5'). A partir destes moldes de ADNcd foram preparados os ADNcs (ver Material e Métodos, acima).

Hibridação de teste de CT17 760 pb e CT17 285 pb

Foram avaliados dois tampões de hibridação diferentes: Tris 10 mM, pH 8,0 e tampão de PCR 1× (Applied Biosystems) (ver Material e Métodos). As reacções inteiras foram corridas num gel de agarose (ver Figura 5).

Hibridação de CT17 760 pb e CT17 285 pb e digestão com ExoI e ExoVII

CT17 760 pb e CT17 285 pb foram hibridados em tampão de PCR 1× com a razão molar 1:5 e depois digeridos com ExoI e ExoVII em duas reacções separadas (ver Material e Métodos).

60 ng de cada produto de digestão foram corridos num gel de agarose (ver Figura 6).

Discussão

A hibridação de teste dos dois fragmentos mostra claramente que a hibridação ocorre na amostra que foi hibridada em tampão de PCR, onde vemos uma banda correspondendo ao híbrido, com uma região de ADNcd e uma ponta saliente de ADNcs de cada lado. Esta banda é menor que o tamanho esperado, 760 pb, mas isto é provavelmente devido a propriedades de migração alteradas conferidas pelas pontas salientes de ADNcs. O ADNcs migra diferentemente do ADNcd num gel de agarose, migrando frequentemente a cerca de metade do tamanho do ADNcd correspondente.

Não houve qualquer hibridação na outra amostra, onde apenas vemos as bandas correspondentes aos dois ADNcs

originais. Isto demonstra que a força iónica do tampão de PCR é adequada enquanto Tris 10 mM não é suficiente para que a hibridação ocorra. Todas as outras hibridações foram feitas em tampão de PCR.

As digestões com Exo I e Exo VII dão os resultados esperados: Exo I, que apenas digere de 3'→5', deixa uma banda onde a ponta saliente de ADNcs na extremidade 5' está ainda presente mas é removida na extremidade 3'. Esta banda é novamente menor que o tamanho esperado (558 pb) mas a ponta saliente de ADNcs na extremidade 5' provavelmente altera o padrão de mobilidade no gel. Exo VII, que digere tanto de 5'→3' como de 3'→5', remove todo o ADNcs saliente e deixa apenas uma banda de ADNcd de 285 pb.

Estas experiências mostram claramente que através de hibridação com um ADNcs complementar, áreas seleccionadas numa sequência nucleotídica podem ser protegidas de digestão com exonucleases.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Alligator Bioscience AB

<120> Método para evolução molecular *in vitro* da função proteica

<130> ALLBA/P36652PC

<150> 0523582.5

<151> 19 de Novembro de 2005

<160> 21

<170> seqwin99

<210> 1

<211> 44

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador directo 1736 SfiI

<400> 1

attactcgcg gccagccgg ccatggcca caggtcaagc tcga 44

<210> 2

<211> 35

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador inverso 1735 NotI

<400> 2

ttagagcctg cggccgcctt gtcategtcg tcctt 35

<210> 3

<211> 44

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador directo 1644 SfiI

<400> 3

attactcgcg gccagccgg ccatggcca caggtcaagc tcga 44

<210> 4

<211> 35

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador inverso 1635 NotI

<400> 4

ttagagcctg cggccgcctt gtcategtcg tcctt 35

<210> 5

<211> 45

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 137

<400> 5

cgcgaattgg cccagccggc catggccgag gtgcagctgt tggag 45

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 138

<400> 6

agatggggga ctagtgctgc tcacggtgac 30

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 350

<400> 7

cctggagcct ggccgaccca 20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 351

<400> 8

gctgggtccg ccaggctcca 20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador de PCR 354

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> Biotinilado

<400> 9
gactctcctg tgcagcctct 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador de PCR 357

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> Biotinilado

<400> 10
ttgtctctgg agatggtgaa 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador de PCR 226

<400> 11
ctcactatag ggccaattgg 20

<210> 12

<211> 28
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador de PCR 415

<400> 12
ttcagatctc gaggtgcagc tgttgag 28

<210> 13
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador de PCR 224

<400> 13
cctattgcct acggcagcc 19

<210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador de PCR 332

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> Biotinilado

<400> 14
cctattgcct acggcagcc 19

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 333

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> Biotinilado

<400> 15

ctcactatag ggccaattgg

20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 349

<400> 16

gactctcctg tgcagcctct

20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 352

<400> 17

ttgtctctgg agatggtgaa

20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 355

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> Biotinilado

<400> 18

cctggagcct ggcggacca

20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 356

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> Biotinilado

<400> 19

gctgggtccg ccaggctcca

20

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 384

<400> 20

cactgccgtg tattactgt

19

<210> 21

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR 386

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> Biotinilado

<400> 21

cagtgtacct tggcccca

18

Lisboa, 2011-09-05

REIVINDICAÇÕES

1. Método para criação de uma sequência polinucleotídica ou população de sequências a partir de sequências polinucleotídicas originais, compreendendo o método os passos de:

(a) proporcionar uma primeira população de moléculas polinucleotídicas e uma segunda população de moléculas polinucleotídicas, a primeira e segunda populações juntas constituindo as cadeias mais e menos da molécula polinucleotídica original;

(b) digestão da primeira e segunda populações de moléculas polinucleotídicas com uma nuclease para gerar fragmentos polinucleotídicos;

(c) contacto dos referidos fragmentos polinucleotídicos gerados a partir das cadeias mais com fragmentos gerados a partir das cadeias menos (sob condições que permitam a ligação dos fragmentos); e

(d) amplificação dos fragmentos que se ligam uns aos outros para gerar pelo menos uma molécula polinucleotídica que difere na sequência da molécula polinucleotídica original,

em que o grau de variabilidade da sequência numa região seleccionada da pelo menos uma molécula polinucleotídica produzida no passo (d) é controlado através da adição de um ou mais oligonucleótidos de variabilidade predeterminada, cujos oligonucleótidos se ligam a uma sequência que reside entre, mas exclui, os nucleótidos terminais 3' e 5' da molécula polinucleotídica original.

2. Método de acordo com a Reivindicação 1 em que os polinucleótidos originais codificam um ou mais motivos proteicos.

3. Método de acordo com a Reivindicação 1 ou 2 em que a primeira e segunda populações de polinucleótidos são ADNc.

4. Método de acordo com a Reivindicação 1, 2 ou 3 em que a primeira e segunda populações de polinucleótidos são de cadeia simples.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que a primeira população de polinucleótidos consiste em cadeias mais das sequências polinucleotídicas originais e a segunda população de polinucleótidos consiste em cadeias menos das sequências polinucleotídicas originais.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que a primeira e segunda populações de polinucleótidos são digeridas separadamente no passo (b).

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que a nuclease no passo (b) é uma exonuclease.

8. Método de acordo com a Reivindicação 7 em que a exonuclease é seleccionada a partir do grupo consistindo em BAL31, exonuclease I, exonuclease V, exonuclease VII, gene 6 da exonuclease de T7, exonuclease do bacteriófago lambda e exonuclease Rec J_f.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que a sequência de aminoácidos alterada da pelo menos uma sequência polinucleotídica produzida no passo (d) está associada a uma propriedade alterada do polipéptido codificado.

10. Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 4 a 9 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são adicionados antes ou no passo (b) e em que a nuclease é específica para polinucleótidos de cadeia simples.

11. Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 9 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são adicionados após o passo (b) e antes ou no passo (c).

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham pelo menos 90% de

identidade de sequência com a sequência interna de uma sequência polinucleotídica original, por exemplo pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham 100% de identidade de sequência com a sequência interna de uma sequência polinucleotídica original.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são de uma única sequência nucleotídica.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são de pelo menos duas sequências diferentes.

16. Método de acordo com a Reivindicação 15 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são variantes da mesma sequência interna de uma sequência polinucleotídica original.

17. Método de acordo com a Reivindicação 15 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham 100% de identidade de sequência com, ou são variantes de, pelo menos duas regiões diferentes dos polinucleótidos originais.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada são produzidos através de PCR propensa a erro ou utilizando um sintetizador de oligonucleótidos.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada têm entre 10 e 500 nucleótidos de comprimento.

20. Método de acordo com a Reivindicação 19 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada têm entre 50 e 200 nucleótidos de comprimento.

21. Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 20 em que as sequências polinucleotídicas originais codificam um ligando.

22. Método de acordo com a Reivindicação 21 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando uma sequência de aminoácidos que interage, directamente ou indirectamente, com uma molécula biológica.

23. Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 20 em que as sequências polinucleotídicas originais codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

24. Método de acordo com a Reivindicação 23 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais, codificando um polipéptido estrutural.

25. Método de acordo com a Reivindicação 23 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando uma CDR.

26. Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 20 em que as sequências polinucleotídicas originais codificam uma enzima ou um fragmento cataliticamente activo desta.

27. Método de acordo com a Reivindicação 26 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando o local activo, um local modulador ou uma região envolvida na estabilidade da enzima.

28. Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 20 em que as sequências polinucleotídicas originais codificam um antigénio.

29. Método de acordo com a Reivindicação 28 em que os oligonucleótidos de variabilidade predeterminada partilham identidade de sequência com, ou são variantes de, uma região das sequências polinucleotídicas originais codificando um epitopo.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o passo (c) compreende ainda a adição de sequências iniciadoras que se ligam às extremidades 3' e/ou 5' de pelo menos um dos polinucleótidos originais sob condições de ligação.

31. Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 30 em que, no passo (b), pelo menos um parâmetro da reacção utilizado para digestão da primeira população de moléculas polinucleotídicas é diferente do parâmetro ou parâmetros equivalentes utilizados na reacção para digestão da segunda população de moléculas polinucleotídicas.

32. Método de acordo com a Reivindicação 31 em que o parâmetro da reacção é seleccionado a partir do tipo de nuclease, concentração da nuclease, volume reaccional, duração da reacção de digestão, temperatura da mistura reaccional, pH da mistura reaccional, comprimento das sequências polinucleotídicas originais, a quantidade de moléculas polinucleotídicas originais e a composição do tampão da mistura reaccional.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que as sequências polinucleotídicas originais foram sujeitas a mutagénese.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que uma ou ambas as populações de fragmentos geradas no passo (b) são sujeitas a mutagénese.

35. Método de acordo com a Reivindicação 33 ou 34 em que a mutagenese é PCR propensa a erro.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o passo (b) é realizado para gerar populações de fragmentos de cadeia simples de comprimentos variáveis.

37. Método de acordo com a Reivindicação 36 em que o passo (b) é controlado para gerar uma população de fragmentos de cadeia simples possuindo um comprimento médio de mais de aproximadamente 50 nucleótidos.

38. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores compreendendo ainda o passo de expressão de pelo menos uma sequência polinucleotídica gerada no passo (d) para produzir o polipéptido codificado.

39. Método de acordo com a Reivindicação 28 compreendendo ainda o passo de teste do polipéptido codificado quanto às características alteradas.

40. Método para produção de um polipéptido possuindo propriedades alteradas, compreendendo o método os seguintes passos:

(a) geração de formas variantes de um polinucleótido original utilizando um método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 39;

(b) expressão dos polinucleótidos variantes produzidos no passo (a) para produzir polipéptidos variantes;

(c) pesquisa dos polipéptidos variantes quanto às propriedades alteradas; e

(d) selecção de um polipéptido possuindo propriedades alteradas a partir dos polipéptidos variantes.

Lisboa, 2011-09-05

FIGURA 1

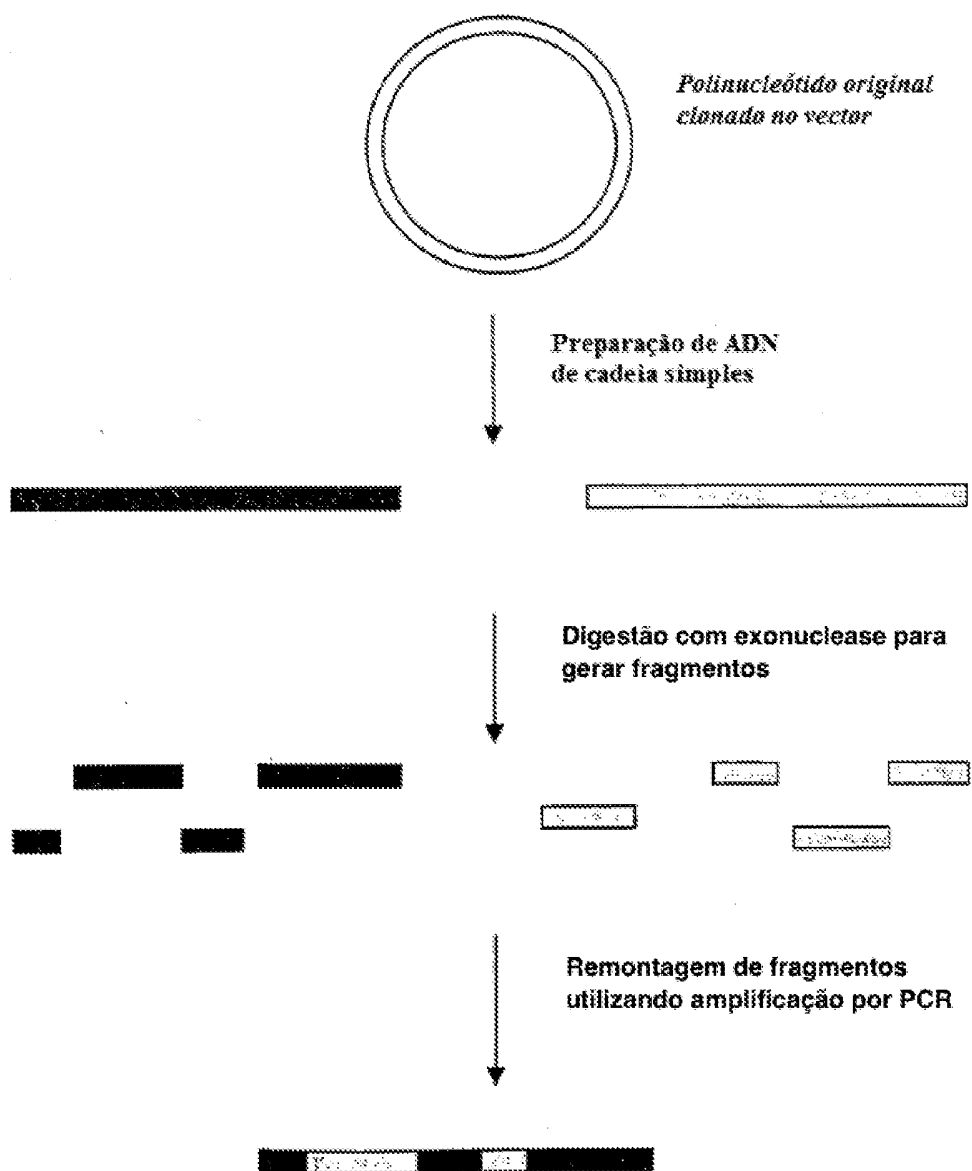


FIGURA 2

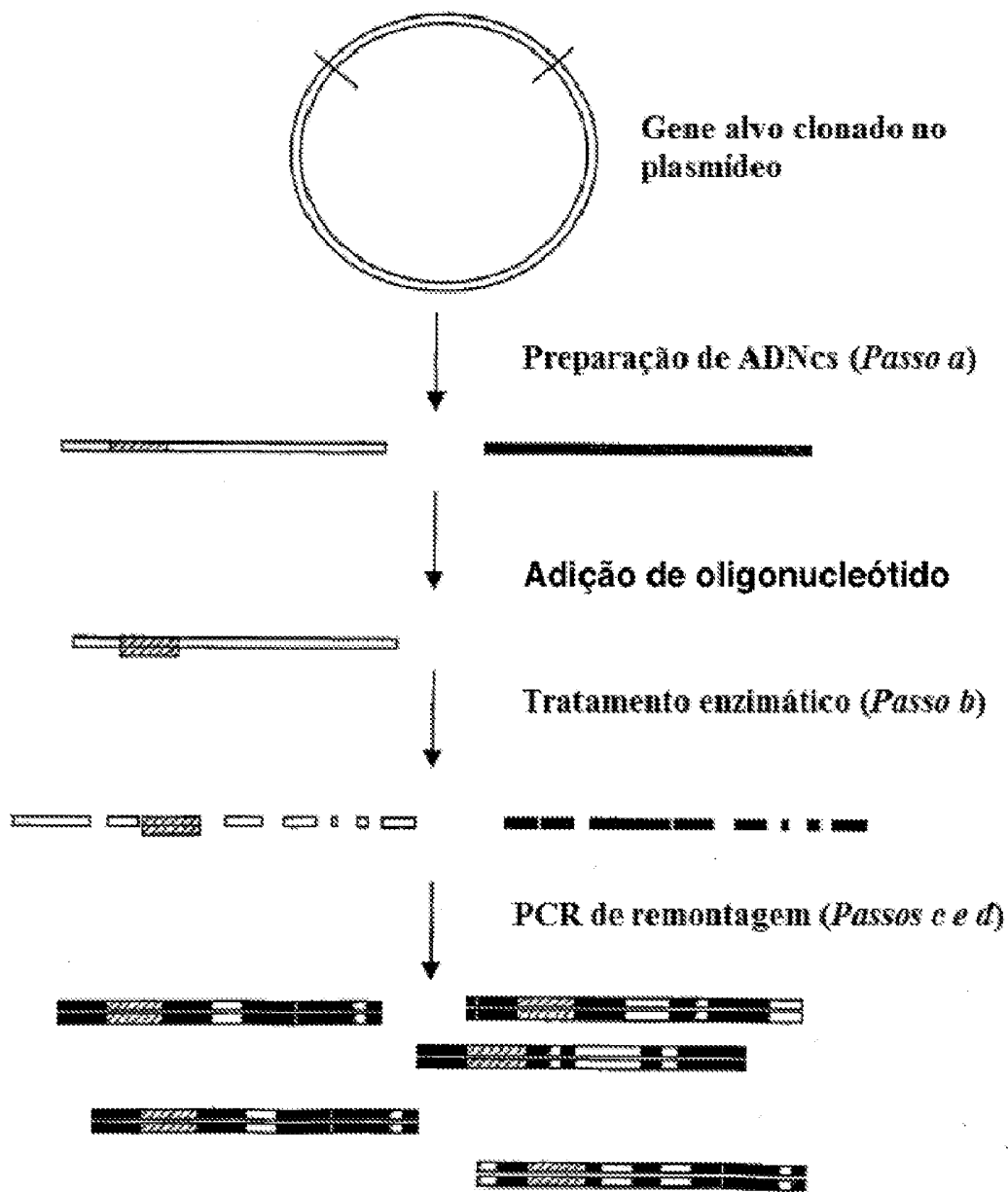


FIGURA 3

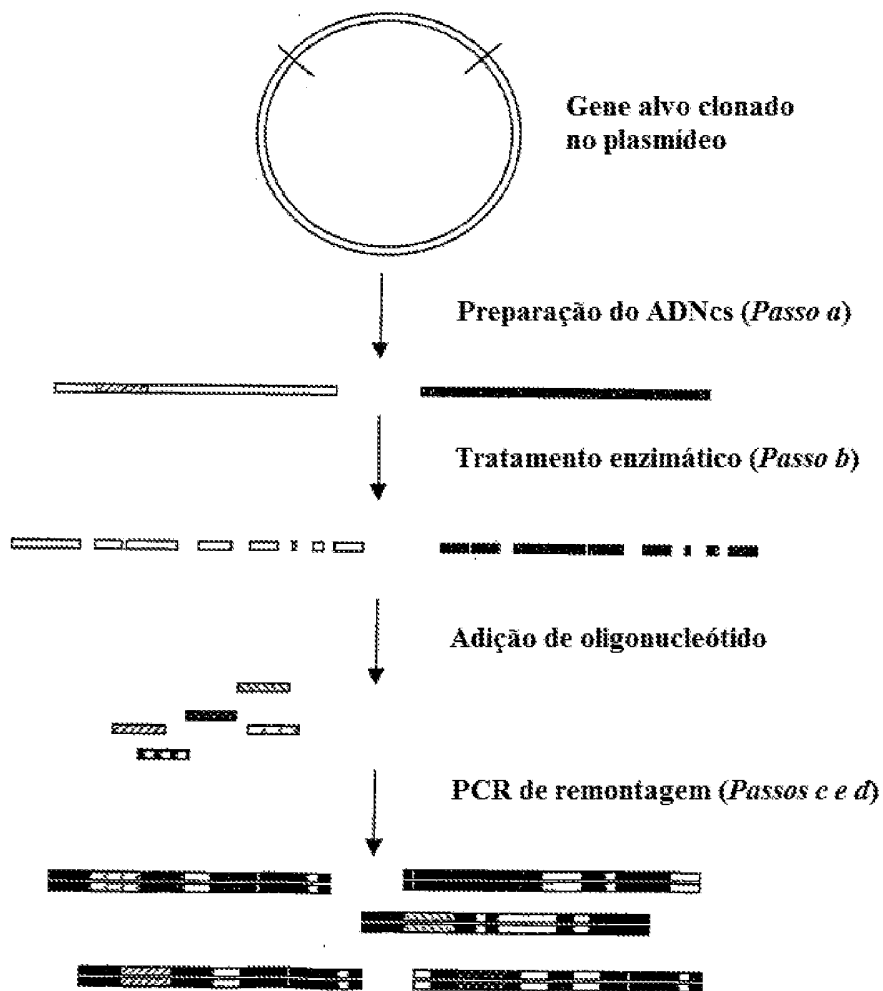


FIGURA 4

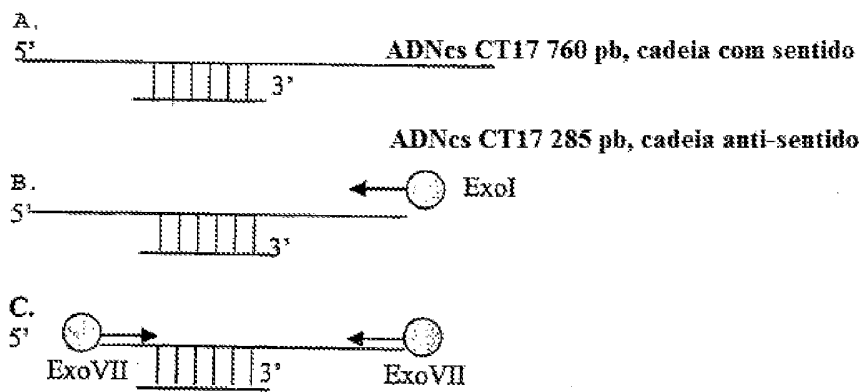


FIGURA 5

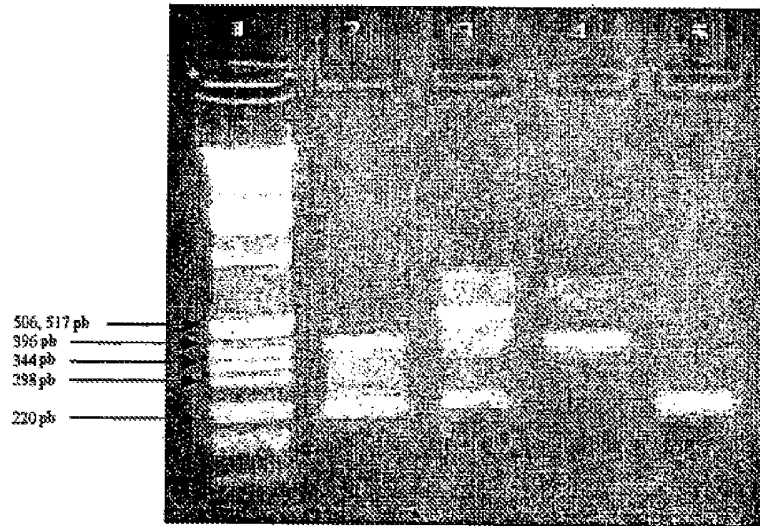


FIGURA 6

