



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 336 982**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99947775 .5**

(96) Fecha de presentación : **08.10.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1117774**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2001**

(54) Título: **Procedimiento para la generación de diversidad.**

(30) Prioridad: **09.10.1998 GB 9822104**
19.01.1999 GB 9901141
09.06.1999 GB 9913435

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2010

(73) Titular/es: **Medical Research Council**
20 Park Crescent
London W1B 1AL, GB

(72) Inventor/es: **Sale, Julian Edward;**
Neuberger, Michael S. y
Cumbers, Sarah Jane

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la generación de diversidad.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para generar diversidad en un gen o producto génico aprovechando la capacidad de hipermutación somática natural de las células productoras de anticuerpos, así como a las estirpes celulares que pueden generar diversidad en productos génicos definidos.

10 Muchos enfoques *in vitro* para la generación de diversidad en productos génicos se basan en la generación de un número muy grande de mutantes que se seleccionan a continuación utilizando potentes tecnologías de selección. Por ejemplo, la tecnología de exposición en fagos ha tenido mucho éxito proporcionando un vehículo que permite la selección de una proteína expuesta (Smith, 1985; Bass *et al.*, 1990; McCafferty *et al.*, 1990; para estudios véase Clackson y Wells, 1994). Asimismo, se han seleccionado ligandos peptídicos específicos para la unión a receptores por selección de afinidad utilizando grandes bancos de péptidos unidos al terminal C del represor LacI de lac (Cull
15 *et al.*, 1992). Cuando se expresa en *E. coli* la proteína represora une físicamente el ligando al plásmido codificador mediante la fijación a una secuencia del operador lac en el plásmido. Además, se ha descrito también un sistema de exposición en el polisoma completamente *in vitro* (Mattheakis *et al.*, 1994) en el que los péptidos nacientes están unidos físicamente mediante el ribosoma al ARN que les codifica.

20 El repertorio primario de especificidades de anticuerpos se crea *in vivo* mediante un proceso de cambio de posición del ADN que implica la unión de segmentos de los genes V, D y J de inmunoglobulina. Después del encuentro del antígeno en el ratón y el hombre, los genes V cambiados de posición en estos linfocitos B que han sido activados por el antígeno se someten a una segunda onda de diversificación, esta vez por hipermutación somática. Esta hipermutación genera el repertorio secundario a partir del que las buenas especificidades de unión pueden seleccionarse permitiendo
25 así la maduración por afinidad de la respuesta inmunitaria humoral.

Los sistemas de selección artificial hasta la fecha se basan mucho en la mutación inicial y en la selección, similar en concepto a la fase inicial del cambio de posición V-D-J que aparece en la producción del anticuerpo natural, porque proporciona la generación de un repertorio "fijo" de mutantes de producto génico a partir del cual pueden seleccionarse
30 los productos génicos que tienen la actividad deseada.

La selección y evolución del ARN *in vitro* (Ellington y Szostak, 1990), denominada a veces SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (Tuerk y Gold, 1990) permite la selección tanto de la actividad de unión como química, pero solamente para los ácidos nucleicos. Cuando la selección es para la unión, una
35 mezcla de ácidos nucleicos se incuba con el sustrato inmovilizado. Los no aglutinantes se lavan fuera, a continuación se liberan los aglutinantes, se amplían y el proceso en su conjunto se repite en etapas iterativas para enriquecer las secuencias que se unen mejor. Este procedimiento puede también adaptarse para que permita el aislamiento de ARN y ADN catalíticos (Green y Szostak, 1992; para estudios véase Chapman y Szostak, 1994; Joyce, 1994; Gold *et al.*, 1995; Moore, 1995). SELEX, por lo tanto, permite etapas cíclicas de mejoramiento de la actividad deseada, pero está
40 limitada en su alcance a la preparación de ácidos nucleicos.

A diferencia en el sistema inmunitario natural, sin embargo, los sistemas de selección artificial son poco adecuados a cualquier forma fácil de "maduración por afinidad" o para las etapas cíclicas de la generación y desarrollo del repertorio. Una de las razones para esto es que es difícil dirigir las mutaciones a las regiones de la molécula donde son
45 necesarias, tanto los ciclos posteriores de mutación como la selección no conducen al aislamiento de las moléculas con actividad mejorada con eficacia suficiente.

Mucho de lo que se conoce acerca del proceso de hipermutación somática que acontece durante la maduración por afinidad en la producción del anticuerpo natural procede de un análisis de las mutaciones que han sucedido durante la hipermutación *in vivo* (para estudios véase Neuberger y Milstein, 1995; Weill y Raynaud, 1996; Parham, 1998). La mayoría de estas mutaciones son sustituciones nucleotídicas individuales que se introducen paso a paso. Ellas se dispersan en un dominio V cambiado de posición, aunque estos puntos conflictivos característicos, y las sustituciones presentan un sesgo para las transiciones básicas. Las mutaciones se acumulan en gran medida durante la expansión de linfocitos B en los centros germinativos (en lugar de durante otras etapas de la diferenciación y proliferación de linfocitos B) con la velocidad de incorporación de sustituciones nucleotídicas en el gen V durante la fase de hipermutación estimada entre 10^{-4} y 10^{-3} pb⁻¹ generación⁻¹ (McKean *et al.*, 1984; Berek y Milstein, 1988).
55

La posibilidad de que las estirpes celulares linfoides puedan proporcionar un sistema tratable para investigar la hipermutación fue considerada hace muchos años (Coffino y Scharff, 1971; Adetugbo *et al.*, 1977; Brüggemann *et al.*, 1982). Evidentemente, es importante que la velocidad de mutación del gen V en la estirpe celular en estudio sea suficientemente elevada no solamente para proporcionar un ensayo operable sino también que asegure que las mutaciones son generadas verdaderamente por el mecanismo de hipermutación de anticuerpos localizado en lugar de reflejar una velocidad de mutación generalmente aumentada ya que está asociada de forma característica a muchos tumores. Se han realizado exhaustivos estudios sobre mutación controlando la reversión de los codones de terminación en V_H en estirpes celulares pre-B y de plasmocitoma de ratón (Wabl *et al.*, 1985; Chui *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1995; estudiado por Green *et al.*, 1988). La estrategia alternativa del secuenciado directo del gen V expresado ha indicado que la diversificación del gen V_H en varios linfomas foliculares, de Burkitt y Hodgkin puede continuar después del
60

caso de transformación inicial (Bahler y Levy, 1992; Jain *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1995 y 1996; Braeuninger *et al.*, 1997). El secuenciado directo ha puesto de manifiesto también una extensión baja de mutaciones en una línea de linfoma folicular clonado exponiendo que la diversificación de V_H puede continuar *in vitro* (Wu *et al.*, 1995). Ninguno de los informes de la mutación constitutiva en las estirpes celulares mencionadas anteriormente proporciona pruebas de que las mutaciones observadas son el resultado de la hipermutación directa, como se observa en la diversificación del anticuerpo natural, que se concentra en los genes V, en oposición a la propensión general a la mutación tal como se describe en muchas estirpes celulares tumorales de diferentes linajes.

Recientemente, la hipermutación se ha provocado en una estirpe celular por Denepoux *et al.* (1997), cultivando las células en presencia de anticuerpo antiinmunoglobulina y linfocitos T activados. Sin embargo, la hipermutación observada se indicó que era provocada, no constitutiva.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas. También se describe en ésta un procedimiento para preparar una estirpe celular linfoide capaz de hipermutación constitutiva dirigida de una región de ácido nucleico diana que comprende la identificación de una población celular para continuar la diversificación de la secuencia diana, y seleccionar una célula en la que la velocidad de mutación del ácido nucleico diana supere la de otra mutación de ácido nucleico en un factor de 100 o más.

Tal como se utiliza en la presente memoria “hipermutación constitutiva dirigida” se refiere a la capacidad, observada por primera vez en los experimentos descritos en la presente memoria, de determinadas estirpes celulares para producir la alteración de la secuencia de ácido nucleico de una o más secciones específicas del ADN endógeno o transgénico de manera constitutiva, que está sin el requisito de estímulo externo. En las células capaces de hipermutación constitutiva dirigida, las secuencias fuera de las secciones específicas del ADN endógeno o transgénico no están sometidas a velocidades de mutación por encima de las velocidades de mutación de fondo.

Una “región de ácido nucleico diana” es una secuencia o región de ácido nucleico en la célula según la invención que está sometida a hipermutación constitutiva directa. El ácido nucleico diana puede comprender una o más unidades de transcripción que codifican productos génicos, que pueden ser homólogos o heterólogos para las células. Las regiones de ácido nucleico diana ilustrativas son los genes V de inmunoglobulina como las encontradas en las células productoras de inmunoglobulina. Estos genes están bajo la influencia de los elementos de regeneración para la hipermutación, como se describe con mayor detalle a continuación, que dirigen la hipermutación al loci en cuestión. Otras secuencias de ácido nucleico diana pueden construirse, por ejemplo sustituyendo las unidades de prescripción génica V en los loci que contienen elementos de regeneración para hipermutación con otra unidad de transcripción deseada, o construyendo genes artificiales que comprenden elementos de regeneración para la hipermutación.

“Hipermutación” se refiere a la mutación de un ácido nucleico en una célula a una velocidad superior a la del fondo. Preferentemente, la hipermutación se refiere a una velocidad de mutación de entre 10^{-5} y 10^{-3} pb⁻¹ generación⁻¹. Esto está en gran medida en exceso de las velocidades de mutación de fondo, que son del orden de 10^{-9} y 10^{-10} mutaciones pb⁻¹ generación⁻¹ (Drake *et al.*, 1988) y de las mutaciones espontáneas observadas en la RCP. 30 ciclos de ampliación con la Pfu polimerasa producirían $<0,05 \times 10^{-3}$ mutaciones pb⁻¹ en el producto, que en el caso presente supondrían menos de 1 en 100 de las mutaciones observadas (Lundberg *et al.*, 1991).

La hipermutación es una parte de la generación natural de los genes con cadena variable (V) de inmunoglobulina. Según la presente invención por consiguiente, la estirpe celular utilizada en el procedimiento es preferentemente una estirpe celular que produce inmunoglobulina que puede producir por lo menos un gen V de inmunoglobulina. Un gen V puede ser un gen con cadena ligera variable (V_L) o con cadena pesada variable (V_H), y puede producirse como parte de una molécula de inmunoglobulina completa; puede ser un gen V de un anticuerpo, un receptor de linfocitos T u otro miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los miembros de la superfamilia de la inmunoglobulina están implicados en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo las funciones extendidas en el sistema inmunitario (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de linfocitos T y similares), la implicación en la adhesión celular (por ejemplo las moléculas de ICAM) y la señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como el receptor PDGF). De este modo, las estirpes celulares preferidas utilizadas en el procedimiento proceden de linfocitos B. Se ha determinado que las estirpes celulares procedentes de linfocitos B que producen anticuerpos pueden aislarse las cuales conservan la capacidad de hipermutar los genes de la región V, todavía no hipermutan otros genes.

En una forma de realización preferida, las células utilizadas en el procedimiento según la invención proceden de las células que hipermutan *in vivo* o están relacionadas con ellas. Las células que hipermutan *in vivo* son, por ejemplo, células que expresan inmunoglobulina, tales como linfocitos B. Las células de linfoma, que son tumores celulares que expresan Ig, son específicamente buenas candidatas para el aislamiento de las estirpes celulares que hipermutan constitutivamente utilizadas en el procedimiento según la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente invención “identificación para la diversificación de la secuencia diana en curso” se refiere a la determinación de la presencia de hipermutación en la región del ácido nucleico diana de las estirpes celulares que se están sometiendo a ensayo. Ésta puede realizarse en una variedad de formas, incluyendo el secuenciado directo o métodos indirectos tales como el ensayo MutS (Jolly *et al.*, 1997) o controlando la generación de varian-

tes de pérdida de inmunoglobulina. Las células seleccionadas según este procedimiento son células que exponen la diversificación de la secuencia diana.

La población celular que está sometida a selección por el procedimiento de la invención puede ser una población policlonal, que comprende una variedad de tipos de células y/o una variedad de secuencias diana o una población (mono-)clonal de células.

Una población de células clonales es una población de células derivadas de un único clon, de modo que las células serían idénticas salvo para las mutaciones que ocurren en las mismas. La utilización de una población de células clonales preferentemente excluye el cultivo conjunto con otros tipos de células, tales como los linfocitos T activados, con el objetivo de provocar la hipermutación del gen V.

Las células utilizadas en el procedimiento según la invención no se basan en la utilización de etapas de inducción para producir hipermutación.

Preferentemente, la población de células clonales identificada en la presente invención procede de un linfocito B. Provechosamente es una estirpe celular de linfoma, tal como un estirpe celular de linfoma de Burkitt, una estirpe celular de linfoma folicular o una estirpe celular de linfoma de macrófagos difusos.

Preferentemente, el procedimiento según la invención comprende además las etapas de aislamiento de una o más células con diversificación de la secuencia diana de exposición, y que compara la velocidad de acumulación de mutaciones en las secuencias diana con la de las secuencias no diana en las células aisladas.

Una característica de la presente invención es que la hipermutación está dirigida solamente a regiones de ácido nucleico "diana" específicas, y no se observa fuera de estas regiones de manera general. La especificidad se ensaya de este modo como parte del procedimiento de la invención ensayando la velocidad de mutación de las secuencias distinta de las secuencias diana. Los genes de la región C, que no están expuestos de manera natural a hipermutación pueden utilizarse ventajosamente en dicha técnica, aunque puede utilizarse también cualquier otra región de ácido nucleico no sometida a hipermutación específica. Como la hipermutación no depende de la secuencia, la secuencia real de la región del ácido nucleico seleccionada a título de comparación no es importante. Sin embargo, no debe someterse a las secuencias de control que dirigen la hipermutación, como se describe a continuación. Convenientemente, la mutación de fondo puede evaluarse mediante análisis de fluctuación, por ejemplo en el loci HPRT [véase Luria y Delbreck., (1943); Capizzi y Jameson, (1973)].

Las células en las que la mutación de la región diana excede la mutación de la región que no es diana son células capaces de dirigir la hipermutación constitutiva de una región de ácido nucleico específica según la presente invención. El factor por el que la mutación del gen de la región V excede a otra mutación génica es variable, pero en general es del orden de por lo menos 10^2 , favorablemente 10^3 , y preferentemente 10^4 o más.

Las velocidades de mutación globales y la diversidad pueden aumentarse, por ejemplo mediante la administración de mutágenos o la expresión de genes que modifican la secuencia, tal como la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT). Sin embargo, la diferencia entre la hipermutación y el fondo no es de esperar que aumente de dicha manera.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un producto génico que tiene una actividad deseada, que comprende las etapas siguientes:

- a) expresión *in vitro* de un ácido nucleico que codifica dicho producto génico ligado funcionalmente a las secuencias de control que dirigen la hipermutación en una población clónica de células linfoides, en la que dicha población clónica de células linfoides pueden alterar una o más secciones específicas del ácido nucleico sin el requisito para la estimulación externa;
- b) identificar una célula o células en la población de células que expresa un producto génico mutante que tiene la actividad deseada; y
- c) determinar una o más poblaciones clonales de células procedentes de la célula o células identificadas en la etapa (b) y seleccionar de dichas poblaciones clonales una célula o células que expresan un producto génico que tiene una actividad deseada mejorada;

en las que las etapas (b) y (c) se repiten de manera iterativa.

La población de células según la parte a) anterior procede de una población clónica de células linfoides que comprende células identificadas por un método como el descrito anteriormente que pueden presentar hipermutación constitutiva de los genes de la región V. El producto génico puede de este modo ser el polipéptido de la inmunoglobulina endógena, un producto génico expresado por un gen endógeno manipulado o un producto génico expresado por una unidad de transcripción heteróloga operativamente unido a secuencias de control que dirigen la hipermutación somática, como se describe con mayor detalle a continuación.

El ácido nucleico que es expresado en las células utilizadas en el procedimiento de la invención y sometidas a hipermutación puede ser una región endógena, tal como la región V endógena, o una región heteróloga insertada en la estirpe celular de la invención. Éste puede tomar la forma, por ejemplo, de una sustitución de la región V endógena con unidad(es) de transcripción heteróloga(s) tal como una región V heteróloga, conservando las secuencias de control endógenas que dirigen la hipermutación; o de la inserción en la célula de una unidad de transcripción heteróloga bajo el control de sus propias secuencias de control para dirigir la hipermutación, en la que la unidad de transcripción puede codificar los genes de la región V o cualquier otro producto génico deseado. El ácido nucleico utilizado en el procedimiento según la invención se describe con mayor detalle a continuación.

En la etapa b) anterior, las células son identificadas por la actividad del producto génico deseado. Éste puede ser, por ejemplo el caso de las inmunoglobulinas, una actividad de unión. Pueden también evaluarse otras actividades, tales como las actividades enzimáticas o similares, utilizando procedimientos de ensayos apropiados. Cuando el producto génico se desplaza de la superficie de la célula, pueden aislarse las células que producen la actividad deseada para la detección de la actividad en la superficie de la célula, por ejemplo por fluorescencia o inmovilizando la célula a un sustrato mediante el producto génico de superficie. Cuando la actividad se segrega en el medio de crecimiento, o de otro modo evaluable solamente para el cultivo celular completo en oposición a cada célula individual, presenta ventajas establecer una diversidad de poblaciones clonales de la etapa a) con objeto de aumentar la probabilidad de identificar una célula que segrega un producto génico que tiene la actividad deseada. Ventajosamente, el sistema de selección empleado no afecta la capacidad de las células para multiplicarse y mutar.

Preferentemente, se seleccionan en esta etapa (y en la etapa c) las células que expresan productos génicos que tienen una actividad mejor, mejorada o más deseable. Dicha actividad es, por ejemplo, una unión de la afinidad mayor para un ligando dado, o una actividad enzimática más eficaz. Por lo tanto, el procedimiento permite la selección de células basándose en la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la actividad deseada.

Se describe asimismo en la presente memoria la utilización de una célula que puede presentar hipermutación constitutiva dirigida de una región del ácido nucleico específica en la preparación de un producto génico que tiene una actividad deseada.

En la utilización descrita en la presente memoria, un ácido nucleico que codifica el producto génico que tiene la actividad deseada está unida funcionalmente a las secuencias de control, que dirigen la hipermutación dentro de la célula. Las generaciones sucesivas de las células de éste modo producen mutantes de la secuencia de ácido nucleico, que son segregadas por el procedimiento de la invención para aislar mutantes con propiedades ventajosas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Diversidad de V_H en estirpes de Burkitt

- (A) Diversidad de secuencias en los genes V_H cambiados de posición de cuatro estirpes de linfoma de Burkitt esporádico, representadas como gráficos circulares. El número de clones M 13 secuenciados para cada estirpe celular está indicado en el centro del gráfico circular; los tamaños de varios segmentos representan la proporción de secuencias que se distinguen por 0, 1, 2, etc. mutaciones (como se indica) a partir del consenso.
- (B) Relación dinástica supuesta de las mutaciones de V_H identificada en el cultivo inicial de Ramos. Cada círculo (con sombreado proporcional a la extensión de la mutación) representa una secuencia distinta con el número de mutaciones acumuladas indicado dentro del círculo.
- (C) Extensión de la mutación en los genes V_L cambiados de posición. Dos cambio de posiciones de V_L están identificados en Ramos. La diversidad y función del origen de la estirpe germinativa se representan en la Figura 1A.
- (D) Comparación de la extensión de mutación en las regiones V_H y C_μ en el cultivo de Ramos inicial. Los gráficos circulares están representados en la figura 1A.

Figura 2. Diversificación constitutiva de V_H en Ramos.

- (A) Diversificación evaluada por un ensayo MutS. Se indica la extensión de la mutación en cada población deducida por clonación directa y secuenciado.
- (B) Relaciones dinásticas deducidas de la descendencia de tres clones de Ramos independientes.

Figura 3. Distribución de sustituciones de nucleótidos no seleccionados en la V_H de Ramos.

Figura 4. La hipermutación en Ramos genera diversos variantes con pérdida de IgM convertibles.

(A) Esquema que presenta el aislamiento de variantes con pérdida de IgM.

(B) Tabla que demuestra que las mutaciones sin sentido múltiples pueden contribuir a la inactivación de V_H . Se enumera cada posición del codón V_H en la que se interrumpe se observa en estas dos poblaciones.

(C) Tabla de velocidades de reversión de variantes de pérdida de IgM.

(D) Secuencia que rodea los codones de interrupción en los derivados con pérdida de IgM.

Figura 5. Variantes con pérdida de IgM en transfectantes de Ramos que expresan TdT.

(A) Análisis de inmunotransferencia Western de la expresión de TdT en tres pSV-p β g/TdT y tres transfectantes de referencia de Ramos.

(B) Gráficos circulares que representan casos de mutación independientes dando lugar a variantes con pérdida de IgM.

Figura 6. Tabla de secuencias que resume las mutaciones en V_H distintas de sustituciones de nucleótidos individuales.

Figura 7. Comparación de las secuencias aisladas de genes V_H de células de Ramos que tienen pérdida de especificidad de unión de antiidiotipo (antiId1). Las sustituciones nucleotídicas que se diferencian en el consenso de población de partida se presenta en negrita. Los cambios de aminoácidos previstos se indican, también en negrita.

Figura 8. Diagrama de barras que presenta el enriquecimiento de las células de Ramos para la producción de una inmunoglobulina con nueva especificidad de unión, por selección iterativa en cinco rondas.

Figura 9. Gráfico de barras que representa la recuperación mejorada de las células de Ramos que fijan una nueva especificidad (estreptavidina) aumentando la relación lecho:célula.

Figura 10. Gráfico que representa el aumento en la recuperación de las células de Ramos de nueva especificidad de unión según la concentración de antígeno diana creciente.

Figura 11. Secuencia V_H derivada de las células de Ramos que se unen a la estreptavidina. En negrita se representan los cambios de nucleótidos observados en comparación con la secuencia V_H de la población de partida y los cambios de aminoácidos previstos.

Figura 12. Cantidad de IgM en los sobrenadantes de células seleccionadas en las rondas 4, 6 y 7 de un proceso de selección para la fijación de estreptavidina, frente al medio de control y al sobrenadante de células de Ramos no seleccionadas.

Figura 13. Fijación con estreptavidina de IgM en los sobrenadantes de la figura 12.

Figura 14. Fijación con estreptavidina de los sobrenadantes de la ronda 4 y de la ronda 6 de una selección para la fijación con estreptavidina, analizada por resonancia de plasmón de superficie.

Figura 15. Análisis FACS de fijación a FITC con estreptavidina de las células seleccionadas en las rondas 4 y 6.

Figura 16. Secuencias V_H y V_L de IgM seleccionada en la ronda 6.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describe una estirpe celular que hipermuta de manera constitutiva regiones de ácido nucleico seleccionadas. Esto permite el diseño de sistemas que producen productos génicos mutados mediante una técnica que refleja la mutación por afinidad en la producción de anticuerpos naturales. La estirpe de Burkitt de Ramos diversifica de manera constitutiva su gen V de inmunoglobulina cambiado de posición durante el cultivo *in vitro*. Esta hipermutación no requiere el estímulo por los linfocitos T activados, las citocinas añadidas de manera exógena o incluso el mantenimiento del receptor antigénico de linfocitos B.

La velocidad de mutación (comprendida en el intervalo de $0,2$ a 1×10^{-4} pb $^{-1}$ generación $^{-1}$) es suficientemente alta para permitir fácilmente la acumulación de una gran base de datos de mutaciones no seleccionadas y así poner de manifiesto que la hipermutación en Ramos presenta la mayoría de las propiedades asociadas clásicamente con la hipermutación del gen V de la inmunoglobulina *in vivo* (la dirección preferencial a V; la acumulación por etapas de sustituciones nucleotídicas individuales; el sesgo de la transición; los puntos conflictivos de la mutación carac-

terísticos). La gran mayoría de las mutaciones en la base de datos no seleccionada son sustituciones nucleotídicas individuales aunque son detectables eliminaciones y repeticiones (algunas veces con una sustitución de nucleótidos flanqueantes). Se ha propuesto también que dichas eliminaciones y repeticiones se generen como consecuencia de la hipermutación *in vivo* (Wilson *et al.*, 1998; Goosens *et al.*, 1998; Wu y Kaartinen, 1995).

El aislamiento de las células que hipermutan de manera constitutiva regiones de ácido nucleico seleccionadas se basa en el control de la mutación génica de V en las estirpes celulares procedentes de las células que producen anticuerpos tales como los linfocitos B. El procedimiento de selección utilizado en la invención puede configurarse de numerosas maneras.

Selección de células hipermutantes

Las células hipermutantes pueden seleccionarse de entre una población de células mediante varias técnicas, incluyendo el secuenciado de secuencias diana, la selección para la expresión de la pérdida de mutantes, el análisis utilizando la proteína bacteriana MutS y la selección para el cambio en la actividad del producto génico.

Una de las propiedades de la hipermutación de los ácidos nucleicos diana es que el proceso da como resultado la introducción de codones de terminación en la secuencia diana con una frecuencia mayor que la que se observaría en ausencia de hipermutación. Esto da como resultado la pérdida de producción de un producto génico procedente de la célula. Esta pérdida puede aprovecharse para identificar células que son secuencias de ácido nucleico hipermutantes.

En una forma de realización preferida de la invención, el ácido nucleico diana codifica una inmunoglobulina. La pérdida de inmunoglobulina puede ser detectada tanto para las células que segregan inmunoglobulinas en el medio de cultivo, como para las células en las que la inmunoglobulina está expuesta en la superficie celular. Cuando la inmunoglobulina está presente en la superficie celular, su ausencia puede identificarse para cada una de las células, por ejemplo por análisis FACS, microscopia inmunofluorescente o inmovilización del ligando a un soporte. En una forma de realización preferida, las células pueden mezclarse con perlas magnéticas revestidas con antígeno que, cuando sedimentan, separarán de la suspensión celular todas las células que tienen una inmunoglobulina de la especificidad deseada expuesta en la superficie.

La técnica puede extenderse a cualquier molécula de inmunoglobulina, incluyendo los anticuerpos, los receptores de linfocitos T y similares. La selección de moléculas de inmunoglobulina dependerá de la naturaleza de la población clónica de células lo que es deseable para el ensayo según la invención.

Alternativamente, las células utilizadas en el procedimiento según la invención pueden seleccionarse por secuenciado de los ácidos nucleicos diana, tal como los genes V, y la detección de mutaciones por comparación de secuencias. Este procedimiento puede automatizarse para aumentar el rendimiento.

En otra forma de realización, pueden detectarse células que hipermutan genes con V evaluando el cambio en la actividad de unión del antígeno en las inmunoglobulinas producidas en una población de células clonales. Por ejemplo, la cantidad de antígeno unido mediante una cantidad unitaria específica de medio o extracto celular puede evaluarse para determinar la proporción de inmunoglobulina producida por la célula que conserva una actividad de unión especificada. A medida que los genes V se mutan, la actividad de unión variará tanto y se reducirá la proporción de inmunoglobulina producida que fija un antígeno especificado.

Alternativamente, las células pueden evaluarse de manera similar la capacidad de desarrollar una nueva afinidad de fijación, tal como exponiéndolas a un antígeno o mezcla de antígenos que inicialmente no están unidos y observando si se desarrolla una afinidad de fijación como resultado de la hipermutación.

En otra forma de realización, el análisis bacteriano MutS puede utilizarse para detectar la variación de secuencia en ácidos nucleicos diana. La proteína MutS se fija a desemparejamientos en los híbridos de ácido nucleico. Al crear heteroduplicados entre los ácidos nucleicos precursores y los de la descendencia potencialmente mutada, puede evaluarse la extensión de la formación desemparejada y de este modo la extensión de la mutación del ácido nucleico.

Cuando el ácido nucleico diana codifica un producto génico distinto de una inmunoglobulina, puede llevarse a cabo la selección identificando la pérdida o alteración de una función distinta de la fijación. Por ejemplo, puede evaluarse la pérdida o alteración de una actividad enzimática.

Las células con hipermutación de la secuencia diana se evalúa la mutación en otras regiones de ácido nucleico. Una región conveniente para evaluar es la región constante (C) de un gen de inmunoglobulina. Las regiones C no están sometidas a hipermutación dirigida según la invención. La evaluación de las regiones C se realiza preferentemente por secuenciado y comparación, ya que éste es el procedimiento más seguro para determinar la *ausencia* de mutaciones. Sin embargo, pueden emplearse otras técnicas, tales como el control para la retención de actividades de la región C, por ejemplo la fijación del complemento, que puede alterarse por episodios de hipermutación.

Adaptación de los productos génicos endógenos

Habiéndose obtenido una estirpe celular que hipermuta de manera constitutiva un gen endógeno, tal como un gen de la región V de inmunoglobulina, en la presente memoria se describe la adaptación del producto génico endógeno, por hipermutación constitutiva, para producir un producto génico con nuevas propiedades. Por ejemplo, en la presente memoria se describe la producción de una inmunoglobulina con una nueva especificidad de unión o una afinidad de fijación alterada.

En la naturaleza se utiliza el procedimiento de hipermutación, para generar especificidades de fijación mejoradas o nuevas en moléculas de inmunoglobulina. De este modo, al seleccionar las células descritas en la presente memoria que producen inmunoglobulinas capaces de unirse al antígeno deseado y a continuación propagando estas células para permitir la generación de más mutantes, pueden aislarse las células que expresan inmunoglobulinas que tienen una fijación mejorada al antígeno deseado.

Puede aplicarse una variedad de procedimientos de selección para el aislamiento de mutantes con una especificidad deseada. Éstos incluyen la Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS), la separación de células utilizando partículas magnéticas, los métodos cromatográficos con antígeno y otras técnicas de separación celular tales como la utilización de perlas de poliestireno.

La separación de células utilizando la captura magnética puede llevarse a cabo conjugando el antígeno de interés con partículas o perlas magnéticas. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con las partículas o perlas de hierro-dextrano superparamagnéticas suministradas por Miltenyi Biotec GmbH. Estas partículas o perlas conjugadas se mezclan a continuación con una población celular que puede expresar una diversidad de inmunoglobulinas superficiales. Si una célula específica expresa una inmunoglobulina capaz de fijar el antígeno, se acomplejará con las perlas magnéticas en virtud de esta interacción. Se aplica a continuación un campo magnético a la suspensión que inmoviliza las partículas magnéticas, y conserva algunas células que se asocian con ellas mediante el antígeno unido por enlace covalente. Las células no unidas que no llegan a fijarse a las perlas se lavan a continuación, dejando una población de células que se aísla meramente en su capacidad para fijar el antígeno de interés. Los reactivos y kits están disponibles en varios proveedores para llevar a cabo dichos aislamientos de una etapa, e incluyen Dynal Beads (Dynal AS; <http://www.dynal.no>), Clasificación de Células Magnéticas por MACS (Miltenyi Biotec GmbH; <http://www.miltenyibiotec.com>), CliniMACS (Am-Cell; <http://amcell.com>) así como Biomag, perlas Amerlex-M y otras.

La Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS) puede utilizarse para aislar células basándose en su diferenciación de las moléculas superficiales, por ejemplo las inmunoglobulinas expuestas en superficie. Las células en la muestra o población que van a clasificarse se tiñen con reactivos de fluorescencia específicos que se unen a las moléculas de la superficie celular. Estos reactivos serían el/los antígeno(s) de interés unido(s) (directa o indirectamente) a marcadores fluorescentes tal como la fluoresceína, Texas Red, verde de malaquita, proteína verde fluorescente (GFP), o cualquier otro fluoróforo conocido por los expertos en la materia. Esta población celular se introduce a continuación en la cámara de flujo vibrante de la máquina de FACS. La corriente celular que sale de la cámara está revestida por una funda de fluido tampón tal como PBS (Solución Salina Tamponada con Fosfato). La corriente se ilumina con luz de láser y en cada célula se mide la fluorescencia, indicando la fijación del antígeno fluorescente marcado. La vibración en la corriente celular hace que se rompa en gotitas, que llevan una pequeña carga eléctrica. Estas gotitas pueden ser conducidas por placas eléctricas de refracción bajo control por ordenador para recoger diferentes poblaciones celulares según su afinidad para el antígeno fluorescente marcado. De esta manera, las poblaciones celulares que presentan diferentes afinidades para el/los antígeno(s) de interés pueden separarse fácilmente de aquellas células que no se unen al antígeno. Las máquinas de FACS y los reactivos para su utilización en FACS están muy disponibles en los proveedores de todo el mundo tales como Becton-Dickinson, o en los proveedores de servicio tales como Arirregión Research Laboratories (<http://www.arl.arirregión.edu/facs/>).

Otro procedimiento que puede utilizarse para separar poblaciones de células según la afinidad a su(s) proteína(s) de la superficie celular para un antígeno específico es la cromatografía por afinidad. En este procedimiento, una resina adecuada (por ejemplo CL-600 Sepharose, Pharmacia Inc.) está unida por enlace covalente al antígeno apropiado. Esta resina se rellena en una columna y la población mixta de células se pasa por la columna. Después de un periodo de incubación apropiado (por ejemplo 20 minutos), se lavan las células no unidas utilizando (por ejemplo) tampón de PBS. Esto deja solamente este subconjunto de células que expresan las inmunoglobulinas que se unen al o a los antígenos de interés, y estas células se eluyen a continuación de la columna utilizando (por ejemplo) un exceso del antígeno de interés, o escindiendo enzimática o químicamente el antígeno de la resina. Esto puede realizarse utilizando una proteasa específica tal como el factor X, trombina u otra proteasa específica conocida por los expertos en la materia para separar el antígeno de la columna mediante una secuencia de escisión apropiada que se ha incorporado previamente en el complejo antígeno-resina. Alternativamente, puede emplearse una proteasa no específica, por ejemplo la tripsina, para separar el antígeno de la resina, liberando de este modo esta población de células que presentaba afinidad para el antígeno de interés.

Inserción de unidades de transcripción heterólogas

Para maximizar las probabilidades de seleccionar rápidamente una variante de anticuerpos capaz de unirse a cualquier antígeno dado, o para aprovechar el sistema de hipermutación para genes que no son de inmunoglobulina, pueden emplearse numerosas técnicas para modificar genéticamente las células según la invención de modo que puedan aprovecharse sus capacidades de hipermutación.

En una primera forma de realización, los transgenes se transfectan en una célula utilizada en el procedimiento según la invención de modo que los transgenes se vuelven dianas para los episodios de hipermutación dirigida.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “transgén” es una molécula de ácido nucleico que se inserta en una célula, tal como por transfección o transducción. Por ejemplo, un “transgén” puede comprender una unidad de transcripción heteróloga mencionada anteriormente, que puede insertarse en el genoma de una célula en una posición deseada.

Los plásmidos utilizados para suministrar el transgén a las células son de construcción convencional y comprenden una secuencia de codificación, que codifica el producto génico deseado, bajo el control de un activador. La transcripción génica de vectores en las células utilizadas en el procedimiento según la invención pueden ser controladas por activadores procedentes de los genomas de virus tales como poliomavirus, adenovirus, virus de viruela aviar, virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus y el Virus de simio 40 (SV40), procedente de activadores heterólogos de mamífero tales como el activador de actina o un activador muy potente, por ejemplo un activador de proteína ribosómica, y procedente del activador asociado normalmente a la secuencia heteróloga de codificación, dichos activadores suministrados son compatibles con el sistema del hospedador utilizado en el procedimiento de la invención.

La transcripción de una secuencia de codificación heteróloga por las células utilizada en el procedimiento según la invención puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son relativamente la orientación y la posición independiente. Muchas secuencias potenciadoras son conocidas en genes de mamífero (por ejemplo elastasa y globina). Sin embargo, se empleará un potenciador procedente del virus de células eucarióticas. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en la última parte del origen de la replicación (100 a 270 pb) y el CMV potenciador del activador precoz. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' en la secuencia de codificación, pero está preferentemente situado en la secuencia 5' del activador.

Ventajosamente, un vector de expresión eucariótica puede comprender una región de control del loci (LCR). Las LCR pueden dirigir la expresión independiente de la secuencia de integración de alto nivel de los transgenes integrados en la cromatina de la célula hospedadora, que es de importancia especialmente cuando la secuencia de codificación heteróloga ha de expresarse en el contexto de una estirpe celular eucariótica transfectada de manera permanente en cuya integración cromosómica del vector ha sucedido, en los vectores diseñados para aplicaciones de terapia génica o en animales transgénicos.

Los vectores de expresión eucariótica contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles normalmente en las regiones 5' y 3' no traducidas de los ADN o los ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la fracción no traducida del ARNm.

Un vector de expresión incluye cualquier vector capaz de expresar una secuencia de codificación que codifica un producto génico deseado es decir unido de manera operativa con las secuencias reguladoras, tales como las regiones activadoras, que son capaces de la expresión de dichos ADN. De este modo, un vector de expresión se refiere a un montaje de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante, u otro vector, que en el momento de la introducción en una célula hospedadora apropiada, da como resultado la expresión de un ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son muy conocidos por los expertos en la materia e incluyen los que son replicables en células eucarióticas y/o procarióticas y los que permanecen episómicos o los que se integran en el genoma de la célula hospedadora. Por ejemplo, los ADN que codifican una secuencia de codificación heteróloga pueden insertarse en un vector adecuado para la expresión de los ADNc en células de mamífero, por ejemplo un vector basado en el potenciador de CMV tal como pEVRF (Matthias, *et al.*, 1989).

La construcción de los vectores utilizados en el procedimiento según la invención emplea técnicas de ligadura convencionales. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN se separan, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Si se desea, el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos contruidos se lleva a cabo de modo conocido. Los métodos adecuados para construir los vectores de expresión, preparando transcritos *in vitro*, introduciendo el ADN en las células hospedadoras y llevando a cabo análisis para evaluar la expresión del producto génico y la función son conocidos por los expertos en la materia. La presencia, la ampliación y/o expresión del gen pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo, por inmunotransferencia Southern convencional, inmunotransferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm, inmunotransferencia de puntos (análisis de ADN o ARN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada de manera apropiada que puede estar basada en una secuencia proporcionada en la misma. Los expertos en la materia preverán fácilmente cómo pueden modificarse estos procedimientos, si se desea.

En una variación del método descrito en la presente memoria, los transgenes comprenden también las secuencias con hipermutación directa. Dichas secuencias han sido caracterizadas, e incluyen las secuencias publicadas en Klix *et al.*, (1998), y Sharpe *et al.*, (1991). Por lo tanto, un loci completo capaz de expresar un producto génico y dirigir la hipermutación para la unidad de transcripción que codifica el producto génico se transfiere al interior de las células. La unidad de transcripción y las secuencias que dirigen la hipermutación son por lo tanto exógenas a la célula. Sin embargo, aunque exógenas las secuencias que dirigen las propias hipermutaciones pueden ser similares o idénticas a las secuencias que dirigen la hipermutación halladas de manera natural en la célula.

En una segunda forma de realización, el o los genes V endógenos o los segmentos de los mismos pueden sustituirse con el o los genes V heterólogos por recombinación homóloga, o por reconocimiento génico utilizando, por ejemplo, un sistema Lox/Cre o una tecnología análoga o mediante la inserción en las estirpes celulares hipermutantes que han eliminado espontáneamente genes V endógenos. Alternativamente, el o los genes de la región V pueden ser sustituidos aprovechando la observación de que la hipermutación se lleva a cabo por roturas de las dobles cadenas en la proximidad de los genes V cambiados de posición.

La invención se describe a continuación con mayor detalle únicamente a título ilustrativo, a partir de los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Selección de una célula hipermutante

Para identificar una célula que experimenta hipermutación *in vitro*, se evalúa la extensión de la diversidad que se acumula en varios linfomas de Burkitt humanos durante la ampliación clónica. Las estirpes BL2, BL41 y BL70 de Burkitt son suministradas gentilmente por G. Lenoir (IARC, Lión, Francia) y Ramos (Klein *et al.*, 1975) es suministrada por D. Fearon (Cambridge, U.K.). Los genes V_H cambiados de posición son ampliados por RCP del ADN genómico utilizando cebadores múltiples de la familia V_H junto con un oligonucleótido de consenso J_H. La ampliación de los segmentos V_H cambiados de posición se lleva a cabo utilizando la Pfu polimerasa junto con uno de los 14 cebadores diseñados para cada una de las familias principales V_H humana (Tomlinson, 1997) y un retrocebador J_H de consenso que hibrida a los seis segmentos J_H humanos (JOL48, 5'-GCGGTACCTGAGGAGACGGTGACC-3', donación de C. Jolly). La ampliación de V_H de Ramos del ADN genómico se lleva a cabo con los oligonucleótidos RVHFOR (5'-CCC CAAGCTTCCCAGGTGCAGCTACAGCAG) y JOL48. La ampliación del ADNc de V_H-C_μ expresado se lleva a cabo utilizando RVHFOR y Cμ2BACK (5'-CCCCGGTACCAGATGAGCTTGGACTTGCGG). La región Cμ1/2 genómica se amplía utilizando Cμ2BACK con Cμ1FOR (5'-CCCCAAGCTTTCGGGAGTGCATCCGCCCC AACCCTT); el alelo de Cμ funcional de Ramos contiene una C en el nucleótido 8 de Cμ2 enfrente de T en el alelo no funcional. Las V_H cambiadas de posición se amplían utilizando 5'-CCCCAAGCTTCCCAGTCTGCCCTGACTCAG y 5'-CCCCTC TAGACCACCTAGGACG GTC-AGCTT. Los productos de la RCP se purifican utilizando las columnas rotativas QIA-quick (Qiagen) y se secuencian utilizando un secuenciador ABI377 después de la clonación en M13. Se calculan las mutaciones utilizando el programa de alineación GAP4 (Bonfield *et al.*, 1995).

El secuenciado de los productos de la RCP clonados pone de manifiesto la considerable diversidad en la estirpe celular de Ramos (una extensión de $2,8 \times 10^{-3}$ mutaciones pb⁻¹ en la V_H) aunque se observa también significativa heterogeneidad en BL41 así como en BL2. Véase la Figura 1A. La diversidad de secuencia en los genes V_H cambiados de posición de las cuatro estirpes esporádicas del linfoma de Burkitt se presentan como gráficos circulares. Los genes V_H cambiados de posición en cada estirpe celular se amplían por RCP y se clonan en M13. Para cada estirpe celular, el consenso se considera como la secuencia común al mayor número de clones M 13 en una contrapartida de la estirpe germinativa (indicada anteriormente en cada gráfico circular) asignada sobre la base de la igualdad más próxima utilizando la base de datos VBASE de las secuencias de inmunoglobulina humana (Tomlinson, 1997). La secuencia de consenso de V_H para Ramos utilizada en la presente memoria se diferencia en 3 posiciones de la secuencia determinada por Chapman *et al.* (1996), de la que cinco posiciones determinadas por Ratech (1992) y seis posiciones de su contrapartida de la estirpe germinativa más próxima V_H4(DP-63).

El análisis de la diversidad de V_H en Ramos se amplía secuenciando los productos de nueve ampliaciones por RCP independientes. Esto permite una relación dinástica probable entre los clones mutados en la población que debe deducirse, minimizando el número de repeticiones independientes supuestas de sustituciones de nucleótidos individuales (Figura 1B). Los 315 clones M13V_H obtenidos a partir de nueve ampliaciones por RCP independientes se secuencian; la dinastía incluye únicamente las secuencias identificadas (en lugar de los intermedios supuestos). Las mutaciones individuales se diseñan según el formato "C230", siendo 230 la posición del nucleótido en el V_H de Ramos (numerados como en la Figura 3) y la "C" que indica la nueva base en esta posición. El criterio utilizado para deducir la genealogía es una minimización del número de sucesos independientes de la misma sustitución nucleotídica. La mayoría de las ramas contienen miembros individuales a las que contribuyen distintas ampliaciones por RCP. Las eliminaciones raras y las repeticiones están indicadas por el prefijo "x" y "d" respectivamente. Las flechas ponen de relieve dos mutaciones (una sustitución en la posición 264 proporcionando un codón de terminación y una repetición en la posición 184) cuya posición en el árbol conlleva que las mutaciones pueden continuar para acumular la siguiente pérdida de expresión de la cadena pesada funcional.

Los artefactos de la RCP contribuyen poco a la base de datos de las mutaciones, no solamente es la extensión de las sustituciones nucleotídicas en gran medida en exceso de las observadas en las ampliaciones por RCP de referencia ($<0,05 \times 10^{-3} \text{ pb}^{-1}$) sino también los clones idénticamente mutados (así como los relacionados dinásticamente) se encuentran en ampliaciones independientes. En muchos casos, las generaciones dentro de un linaje se diferencian en una única sustitución de nucleótidos indicando que solamente un pequeño número de sustituciones se ha introducido en cada ronda de mutación.

El análisis de los cambios de posición de V_{λ} pone de manifiesto que Ramos aloja un cambio de posición en el marco de $V_{\lambda,2,2-16}$ (como describe Chapman *et al.* 1996)) y un cambio de posición fuera del marco de $V_{\lambda,2,2-25}$. Existe diversidad mutacional en ambos V_{λ} cambiados de posición aunque se ha acumulado mayor diversidad en el alelo no funcional (Figura 1C).

Una característica clásica de la hipermutación de anticuerpos es que las mutaciones se acumulan en gran medida en la región V pero poco en la C. Resulta asimismo evidente en las mutaciones que se han acumulado en el loci de IgH de Ramos (Figura 1D). Los clones de M13 que contienen inserciones de ADNc se extienden en V_H , $C_{\mu 1}$ y en los primeros 87 nucleótidos $C_{\mu 2}$ se generan por RCP en el cultivo inicial de Ramos. Los gráficos circulares (presentados en la Figura 1A) representan la cantidad de mutación identificada en el segmento de 341 nucleótidos de V_H en comparación con el segmento de 380 nucleótidos de C_{μ} que se extienden desde el comienzo de $C_{\mu 1}$.

La inmunoglobulina IgM producida por Ramos está presente tanto en la superficie de las células como, en forma segregada, en el medio de cultivo. El análisis del medio de cultivo pone de manifiesto que Ramos segrega moléculas de inmunoglobulina a una concentración muy alta, aproximadamente de $1 \mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, Ramos puede segregar inmunoglobulinas en una cantidad que la hace innecesaria para volver a clonar genes de inmunoglobulina en las estirpes celulares de expresión o en bacterias para producción.

Ejemplo 2

La diversificación de V_H en Ramos es constitutiva

Para estudiar si la diversificación del gen V está en curso, se clonan las células y se evalúa la diversidad de V_H utilizando un análisis basado en MutS después de periodo de cultivo *in vitro*. La V_H de Ramos es la RCP ampliada y purificada como se describió anteriormente utilizando oligonucleótidos que contienen una base biotinilada en el terminal 5'. Después de la desnaturalización/renaturalización (99°C durante 3 min; 75°C durante 90 min) se evalúa la ampliación de la mutación controlando la fijación del material heteroduplicado desemparejado con la proteína MutS bacteriana de reparación de la incompatibilidad, fijada en el filtro, con detección por ECL como se describió anteriormente (Jolly *et al.*, 1997).

Los resultados indican que la diversificación de V_H está verdaderamente en curso (véase la figura 2A). El ADN se extrae de las células de Ramos que se han cultivado durante 1 ó 3 meses después de limitar la clonación por dilución. El V_H cambiado de posición es ampliado por RCP utilizando oligonucleótidos biotinilados antes de que experimenten la desnaturalización/renaturalización; los heteroduplicados incompatibles se detectan a continuación mediante la fijación a MutS inmovilizada como se describió anteriormente (Jolly *et al.*, 1997). Una alícuota del ADN renaturalizado se une directamente a las membranas para confirmar la carga del ADN emparejado (control del ADN total). Los ensayos realizados en la V_H de Ramos ampliada de una plantilla de plásmido bacteriano así como del cultivo de Ramos inicial se incluyen para comparación.

Los genes de V_H se amplían por RCP a partir de los cultivos de Ramos que han sido ampliados durante cuatro (Rc1) o seis (Rc13 y 14) semanas (figura 2B). Una velocidad de mutación para cada clon se indica y se calcula dividiendo la extensión de mutaciones de V_H independientes a las 4 ó 6 semanas después de la clonación por el número supuesto de divisiones celulares basadas en un tiempo de generación de 24 h. Las secuencias ponen de manifiesto la acumulación de la mutación etapa a etapa con una velocidad de mutación de aproximadamente $0,24 \times 10^{-4}$ mutaciones pb^{-1} generación $^{-1}$.

La comparación directa de la velocidad de mutación de V_H en Ramos con la de otras estirpes celulares no es sencilla ya que existe poca información sobre las velocidades de mutación en otras estirpes tal como se interpreta por las mutaciones no seleccionadas incorporadas en toda V_H obtenida después de la expansión de la clonación procedente de una sola célula precursora. Sin embargo, la extensión de mutaciones después de una ampliación de dos semanas de 50 células precursoras BL2 se ha determinado en las condiciones de inducción de la mutación ($2,7 \times 10^{-3}$ mutaciones pb^{-1} ; Denépoux *et al.*, 1997). Experimentos similares realizados con Ramos en las condiciones de cultivo normal ponen de manifiesto un extensión de mutación de $2,3 \times 10^{-3}$ mutaciones pb^{-1} . Se han realizado sin éxito varios intentos para potenciar la velocidad de mutación mediante la provisión de citocinas, linfocitos T colaboradores, etc. De este modo, la velocidad de mutación que puede conseguirse por inducción específica en las células BL2 parece ser similar a la velocidad constitutiva de la mutación de V_H en Ramos.

Ejemplo 3

Examen de la naturaleza de las mutaciones de V_H en Ramos

Se crea una base de datos de episodios de mutación que combina las detectadas en el cultivo inicial de Ramos (de 141 secuencias distintas) con las detectadas en cuatro subclones que se han cultivado en varios experimentos sin selección específica (procedentes de más de 135 secuencias distintas). Esta base de datos se crea después que las series de secuencias individuales se han reunido en relaciones dinásticas (como se detalla en la leyenda de la figura 1B) para asegurar que la expansión clónica de una célula individual mutada no conduce a un caso de mutación específico que se recuenta muchas veces. Se describe un análisis de esta base de datos del compuesto de 340 casos de mutación distintos y supuestamente no seleccionados (el cultivo de Ramos contribuyó con 200 y 140 los subclones expandidos); el análisis independiente de poblaciones de subclón conduce a idénticas conclusiones.

La abrumadora mayoría de las mutaciones (333 de cada 340) son sustituciones de un solo nucleótido. Un pequeño número de eliminaciones (4) y duplicaciones (3) se observan pero sin inserciones sin plantillas; estos casos se discuten con mayor detalle a continuación. Existen solamente cinco secuencias que presentaban sustituciones de nucleótidos en posiciones adyacentes; sin embargo, en tres de estos cinco casos, la genealogía puso de manifiesto que las sustituciones adyacentes se han incorporado sucesivamente. De este modo, la creación simultánea de sustituciones de nucleótidos en posiciones adyacentes es un caso raro.

La distribución de las mutaciones a lo largo de la V_H es muy no aleatoria (véase la figura 3). Independientemente las sustituciones de bases que se producen se indican en cada posición del nucleótido. Se indican las posiciones de CDR1 y 2. Las posiciones de nucleótidos están numeradas a partir del terminal 3' del cebador de secuenciado con la posición +1 del nucleótido correspondiente a la primera base del codón 7; los codones se numeran según Kabat. Las mutaciones indicadas en cursiva (posición del nucleótido 15, 193, 195 y 237) son sustituciones que se producen en un subclón mutado y han revertido la secuencia en esta posición para el consenso indicado.

El principal punto conflictivo está en los nucleótidos G y C del codón Ser82a, que ha sido identificado previamente como un punto conflictivo principal de mutación intrínseca en otros genes V_H (Wagner *et al.*, 1995; Jolly *et al.*, 1996) y conforme al consenso RGYW (Rogozin y Kolchanov, 1992; Betz *et al.*, 1993). Aunque el punto conflictivo de la mutación intrínseca dominante en muchos genes con V_H está en Ser31, este codón no está presente en el V_H de consenso de Ramos (o su contrapartida de la línea germinal) que tiene Gly en esta posición. Las sustituciones de nucleótidos individuales presentan un marcado sesgo a favor de las transiciones (51% en lugar del 33% esperado al azar). Existe también una preferencia sorprendente para dirigir G y C que asciende al 82% de los nucleótidos dirigidos (Tabla 1).

TABLA 1

Preferencias de sustitución de nucleótidos de la hipermutación en Ramos

Nucleótido precursor	Frecuencia de sustitución para				Total
	T	C	G	A	
T	-	3,9	1,2	3,0	8,1
C	17,4	-	12,6	4,8	34,8
G	7,2	15,9	-	24,0	47,1
A	2,4	1,8	5,7	-	9,9
Las sustituciones de un solo nucleótido están calculadas en la cadena de codificación con V _H y se expresan como porcentaje del número total (333) de sustituciones de nucleótidos independientes, no seleccionadas identificadas.					

Ejemplo 4

Selección de células hipermutantes por pérdida de IgM

El análisis de las variantes de Ramos pone de manifiesto varias mutaciones que deben tener V_H inactivado (véase la figura 1B) lo que sugiere que puede ser posible que las células pierdan la expresión de IgM pero permanezcan viables. Si es este el caso, la pérdida de expresión de Ig sería un medio fácil para seleccionar una estirpe de linfocitos B hipermutante de manera constitutiva.

El análisis del cultivo de Ramos pone de manifiesto que contiene 8% de las células superficiales con IgM. Dichas variantes con pérdida de IgM se generan durante el cultivo *in vitro*, de la forma siguiente. El cultivo de partida de Ramos se transfecta con un plásmido pSV2neo, diluido en placas de 96 pocillos y clones creciendo en un medio selectivo que se deja que se expanda. La citometría de flujo realizada en los clones expandidos seis meses después de la transfección original pone de manifiesto la presencia de variantes de la pérdida de IgM que constituyen el 16% y el 18% de las dos poblaciones clonales (Rc13 y Rc14) mostradas en esta memoria (figura 4A). El enriquecimiento mediante una sola ronda de clasificación proporciona subpoblaciones que contienen células negativas a IgM con 87% (Rc13) y 76% (Rc14) de superficie. Después de la ampliación por RCP del gen con V_H cambiado de posición en estas subpoblaciones, el secuenciado pone de manifiesto que el 75% (Rc13) y el 67% (Rc14) de los segmentos con V_H clonados contenía una mutación sin sentido (terminación), eliminación (del) o duplicación (dup) en el tramo V_H de 341 nucleótidos analizado. El resto de los clones son naturales diseñados (wt) aunque no se intentan discriminar posibles mutaciones sin sentido que inactivan V_H . Las 4 eliminaciones y las 3 duplicaciones identificadas en la población Rc13 son todas distintas mientras que solamente 4 mutaciones distintas totalizan las 7 secuencias Rc14 determinadas que contienen eliminaciones. La naturaleza de las eliminaciones y de las duplicaciones se presenta en la figura 6. Cada caso se denomina con una letra seguida de un número. La letra proporciona la conveniencia de la mutación (A, B y C son los transfectantes de control de TdT⁻ clonados, D, E y F los transfectantes de TdT⁺ y U significa los casos identificados en el cultivo inicial de Ramos no seleccionado); el número indica la posición del primer nucleótido en la cadena de la secuencia. Los nucleótidos eliminados se especifican por encima de la línea y los nucleótidos añadidos (duplicados o inserciones sin plantilla) por debajo de la línea; las sustituciones de un solo nucleótido están rodeadas con un círculo en la nueva base que se especifica. Los segmentos duplicados de origen V_H están subrayados; las inserciones sin plantilla están en negrita. Con varias eliminaciones o duplicaciones, el caso está flanqueado por un solo nucleótido de procedencia desconocida. Dichos cambios de flanqueo podrían bien surgir por sustitución del nucleótido (en lugar de la inserción sin plantilla) y estos casos por consiguiente se agrupan independientemente; la asignación de la sustitución de una sola base (rodeada con un círculo) de uno a otro extremo de la eliminación/duplicación es con frecuencia arbitraria.

Las células IgM⁻ están enriquecidas en una sola ronda de clasificación antes de la ampliación por RCP y la clonación de sus segmentos de V_H . Las secuencias ponen de manifiesto un intervalo considerable de mutaciones que inactivan V_H (codones de terminación o desplazamientos del marco) (figura 4) aunque diversas mutaciones inactivadoras resultan todavía evidentes en las variantes por pérdida de IgM clasificadas después de solo 6 semanas de expansión clónica (véase la figura 5). En la expresión de TdT en la figura 5A en tres pSV-p β G/TdT y tres transfectantes de referencia de Ramos se comparan por análisis de inmunotransferencia Western de extractos de proteína nuclear. Nalm6 (linfoma de linfocitos pre-B humanos positivos a TdT) y HMy2 (linfoma B humano maduro negativo a TdT) proporcionaron referencias.

En la figura 5B, se presentan gráficos circulares que representan episodios de mutación independientes que dan lugar a variantes con pérdida de IgM. Las variantes de IgM⁻ (que constituyen del 1 al 5% de la población) se obtienen clasificando los tres transfectantes de referencia TdT⁺ y los tres TdT⁻ que se han cultivado durante seis semanas después de la clonación. Las regiones V_H en las subpoblaciones clasificadas son ampliadas y secuenciadas por RCP. Los gráficos circulares representan los tipos de mutación que dar lugar a la inactivación de V_H con los datos obtenidos procedentes de las subpoblaciones de IgM⁻ TdT⁺ y TdT⁻ agrupadas por separado. Las abreviaturas son como en la figura 4A excepto que “ins” indica los clones que contienen inserciones de nucleótidos aparentemente sin plantilla. Los clones que contienen eliminaciones o duplicados junto con las inserciones sin plantilla de nucleótidos múltiples están incluidos solamente dentro del segmento “ins” del gráfico circular. Solamente se calculan los episodios de mutaciones inequívocamente distintos. Por lo tanto, de las 77 mutaciones que inactivan 77 V_H distintas identificadas en las subpoblaciones con pérdida de IgM de TdT⁺, se identifican 30 mutaciones del codón con distinta terminación; si el mismo codón de terminación se ha creado independientemente dentro de la población con pérdida de IgM procedente de un solo transfectante de Ramos, éste se habría subrayado.

Los codones de terminación se crean en una variedad de posiciones (figura 4B) pero no están situados al azar. La figura 4B resume la naturaleza de los codones de terminación observados en las poblaciones con pérdida de IgM de Rc13 y Rc14. Por lo menos 8 episodios de mutación independientes proporcionan las mutaciones sin sentido que totalizan 20 de cada 27 secuencias de V_H no funcionales en la base de datos de Rc13; por lo menos diez episodios de mutación independientes proporciona a las mutaciones sin sentido que totalizan 15 de las 22 secuencias de V_H no funcionales en la base de datos de Rc14. Los números entre paréntesis después de cada codón de terminación dan el número de secuencias en las que la base de datos que lleva el codón de terminación apropiado seguido del número de estas secuencias que son distintas, discriminadas en las bases de las mutaciones adicionales. Los análisis de los codones de terminación en las variantes con pérdida de IgM seleccionadas de entre otras cuatro poblaciones clonales ponen de manifiesto la creación del codón de terminación en unas cinco posiciones más dentro de V_H . En los datos obtenidos en seis experimentos independientes, la creación del codón de terminación está restringida a 16 de las 39 posibles regiones; las secuencias de ADN en estas regiones preferidas que están sesgadas (o la cadena de codificación o no codificadora) como contribución al consenso de RGYW.

No es sorprendente, que mientras las eliminaciones e inserciones totalizan solamente una pequeña proporción de las mutaciones en los cultivos de Ramos no seleccionados (véase anteriormente), hacen una contribución mucho mayor cuando se centra la atención en las mutaciones con inactivación de V_H . Es destacable que una gran proporción de las variantes con pérdida de IgM puedan totalizarse para las mutaciones de codón de terminación/por desplazamiento del marco en el propio V_H . Esto apoya más la propuesta de que la hipermutación en Ramos se dirige preferentemente

al dominio V de la inmunoglobulina, ciertamente en lugar de al dominio C o, realmente a otros genes (tales como la funda de $I\gamma\alpha/I\gamma\beta$) cuya mutación podría conducir a un fenotipo de IgM^- de superficie. Además puede ser que V_H de Ramos se dirija más frecuentemente a hipermutación que su V_L cambiada de sitio de manera productiva, una conclusión apoyada en el modelo de mutaciones en el cultivo inicial (figura 1C).

La selección de las células por detección de las variantes por pérdida de Ig es particularmente útil cuando estas variantes pueden revertir, es decir readquirir su capacidad endógena de expresar Ig. La dinastía creada al principio (figura 1B) sugiere no solamente que podrían surgir las fundas con pérdida de Ig sino también que podrían experimentar más mutación. Para confirmar esto, las variantes con pérdida de Ig clasificadas a partir de Rc13 se clonan por dilución limitativa. Tres semanas después de la clonación, la presencia de reversores de IgM^+ en los subclones de IgM^- se identifica por análisis de inmunofluorescencia citoplásmica de 5×10^4 células; se proporciona su extensión (figura 4C). Estos reversores de IgM^+ se enriquecen a continuación en una sola ronda de clasificación y las secuencias de V_H de la variante clónica de IgM^- se comparan con la de sus descendientes reversores de IgM^+ .

La inmunofluorescencia citoplásmica de diez poblaciones clonales expandidas ponen de manifiesto la presencia de neutralizantes de IgM^+ al variar la extensión (de 0,005% a 1,2%; figura 4C) permitiendo una velocidad de mutación de 1×10^{-4} mutaciones pb^{-1} generación $^{-1}$ que debe calcularse por análisis de la fluctuación. Esto es algo mayor que la velocidad calculada por análisis directo de las mutaciones no seleccionadas ($0,25 \times 10^{-4}$ mutaciones pb^{-1} generación $^{-1}$; véase anteriormente), probablemente reflejando en parte que diferentes clones con pérdida de IgM neutralizan a diferentes velocidades dependiendo de la naturaleza de la mutación perturbadora. Verdaderamente, la secuencia que rodea los codones de terminación en los derivados con pérdida de IgM de Rc13 ponen de manifiesto que TAG32 se ajusta bien al consenso de RGYW (R=purina, Y=pirimidina y W=A o T; Rogozin y Kolchanov, 1992) que totaliza una gran proporción de puntos conflictivos de la mutación intrínseca (Betz *et al.*, 1993) mientras que TAA33 y TGA36 no (figura 4D).

Ejemplo 5

Selección de una nueva actividad de unión de Ig

En los experimentos diseñados para demostrar el desarrollo de nuevas afinidades de fijación, se observa que la mayoría de los miembros de la estirpe celular de Ramos descritos a continuación expresan una molécula de IgM de la membrana que une anticuerpos antiidiotipo (antiId1 y antiId2), específicamente aparecidos contra la IgM de la superficie de Ramos. Sin embargo, unas pocas células conservan una IgM en superficie, aunque no pueden unir el anticuerpo antiidiotipo. Esto es debido a una alteración en la afinidad de fijación en la molécula de IgM en superficie, de modo que el anticuerpo ya no se une. Las células que expresan una IgM en superficie aunque no pueden fijar el anticuerpo pueden seleccionarse en una sola ronda de clasificación de células según la invención.

Esto se demuestra aislando clones positivos a μ /negativos a id que han perdido la capacidad para unirse a antiId2 a pesar de la retención de una IgM en superficie, por ELISA. Los clones son secuenciados y en seis clones independientes se encuentra un resto de V_H conservado, K70, para ser mutado a N, M o R de la manera siguiente:

Clon	Mutación
2	K70N AAG-AAC
	S77N AGC-AAC
4	K70M AAG-ATG
9	S59R AGT-AGG
	K70N AAG-AAC
10	K70N AAG-AAC
12	K70N AAG-AAC
13	K70R AAG-AGG

No se observaron mutaciones en la cadena ligera. De este modo, es evidente que los mutantes pueden seleccionarse de entre la estirpe celular de Ramos en la que la molécula de Ig producida tiene una variación de un solo par de bases con respecto al clon precursor.

Haciendo uso de un antiId1, una población similar de células se aísla la cual conserva la expresión de la región constante $I\gamma\mu$ pero que ha perdido la fijación al anticuerpo antiidiotípico. Estas células se enriquecen por citometría de clasificación y la secuencia de V_H es determinada (figura 7). Esto pone de manifiesto seis mutaciones cuando se compara con la secuencia de consenso de la población de partida. Dos de estas mutaciones dan como resultado cambios de secuencia de aminoácidos alrededor de CDR3 (R→T en 95 y P→H en 98). Por lo tanto, puede seleccionarse la selección de cambios más sutiles en la molécula de inmunoglobulina analizando la pérdida de fijación.

En experimentos adicionales, las células hipermutantes según la invención se lavan, se vuelven a poner en suspensión en PBS/BSA (10^8 células en 0,25ml) y se mezclan con un volumen igual de PBS/BSA que contiene 10% de perlas magnéticas revestidas de antígeno (v/v). En el presente experimento, se utilizan perlas magnéticas (Dyna) recubiertas con estreptavidina. Después de la mezcla a 4°C en un rodillo durante 30 min., las perlas se lavan tres veces con PBS/BSA, atrayendo cada vez las perlas con un imán y separando las células no unidas, las células restantes se siembran a continuación en placas de 96 pocillos y se multiplican hasta 10^8 células antes de experimentar una ronda adicional de selección. Se llevan a cabo múltiples rondas de expansión celular (acompañadas de hipermutación constitutivamente en curso) y selección. Tras múltiples rondas de selección, comienza a aumentar la proporción de células que se unen a las perlas, que está inicialmente en niveles de fondo o próximos a ellos de 0,02%.

Después de 4 rondas, se observa el enriquecimiento de las células que se fijan a estreptavidina. Esto se repite en la quinta ronda (figura 8). La recuperación de bajo porcentaje refleja la saturación de las perlas con las células ya que cambiando la relación célula:perla a partir de este amplio exceso a 1:2 permite una recuperación de aproximadamente el 20% a partir de cinco rondas de células que se fijan con estreptavidina (figura 9). Esto demuestra la selección lograda de una nueva especificidad de unión a partir de la estirpe celular de Ramos hipermutante, por cuatro rondas de selección iterativa.

El secuenciado de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera procedentes de las células de fijación con estreptavidina predice el cambio de un aminoácido en CDR3 de V_H y cuatro cambios en V_L (1 en FR1, 2 en CDR1 y 1 en CDR2) cuando se compara con la secuencia de consenso de la producción de partida (figura 11).

Para garantizar que la fijación de la estreptavidina depende de la expresión de la inmunoglobulina de superficie, se enriquecen variantes negativas de inmunoglobulina de las células que se fijan con estreptavidina por citometría de clasificación. Esto reduce notablemente la recuperación de las células que se fijan con estreptavidina con un exceso de perlas. Las células recuperadas mediante las perlas con estreptavidina de Dynal a partir de las células negativas clasificadas son de hecho positivas a IgM y lo más probable es que representen la recuperación de la eficacia de las células que se fijan con estreptavidina de IgM contaminando la población de células clasificadas negativas a la inmunoglobulina.

Los datos preliminares sugieren que la eficacia de recuperación se reduce a medida que se reduce la concentración de estreptavidina en las perlas (figura 9). Esto se confirma ensayando la recuperación de las células que se unen a la estreptavidina con las perlas incubadas en un intervalo de concentraciones de estreptavidina (figura 10). El porcentaje de células recuperables a partir de una población de fijación vienen dictado por la relación de perlas a células. En este experimento la relación es de perlas:células < 1:1.

En una serie adicional de experimentos, se completan dos rondas más de selección, siendo el total de 7. Esto se realiza reduciendo la concentración de estreptavidina unida a las perlas desde 50 $\mu\text{g/ml}$ en la ronda 5 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ en la ronda 7. Aunque los niveles de secreción de IgM son comparables para las poblaciones seleccionadas en las rondas 4 a 7 (figura 12), la fijación de la estreptavidina evaluada por ELISA evidentemente aumenta en gran medida en las rondas 6 y 7, en comparación con la ronda 4 (figura 13).

Esto se confirma por la evaluación de la fijación por Resonancia de Plasmón en superficie en un chip BiaCore recubierto con estreptavidina (figura 14). El sobrenadante de la ronda 7 se inyecta para que circule a través del chip en el punto A, y se interrumpe en el punto B. En el punto C, se inyecta IgM antihumana, para demostrar que el material unido a la estreptavidina es IgM. El gradiente A-B representa la asociación constante, y el gradiente B-C la disociación constante. A partir de la señal BiaCore es evidente que el sobrenadante de la ronda 6 presenta características de fijación superiores a las aisladas procedentes de las poblaciones de la ronda 4 o de las células de Ramos no seleccionadas.

Los anticuerpos procedentes de la ronda 6 del procedimiento de selección también presentan fijación mejorada con respecto a la ronda 4. La fijación de las células de las selecciones de la ronda 6 a los agregados de estreptavidina-FITC, formados por preincubación del fluoróforo con una proteína biotinilada, pueden observarse por FACS, como se muestra en la figura 15. No se observa fijación a las poblaciones de la ronda 4, de células de Ramos no seleccionadas o de Ramos negativas a IgM, lo que indica maduración de la fijación de estreptavidina.

La utilización de estreptavidina-FITC no agregada no produce similares resultados, con la mayoría de las células de la ronda 6 sin fijación. Esto, de acuerdo con los datos de ELISA, sugiere que la fijación a la estreptavidina es debida a la aidez de la fijación del anticuerpo a una matriz de antígeno, en lugar de a una afinidad monovalente. Los aglutinantes de mayor actividad pueden aislarse mediante clasificación para la fijación a estreptavidina-FITC no agregada.

Para determinar las mutaciones responsables del aumento de fijación observado en las células de la ronda 6 sobre las células de la ronda 4, los genes de anticuerpo de cadena ligera y pesada se amplían por RCP, y a continuación se secuencian. En comparación con las células de la ronda 4, no se observan cambios en los genes de la cadena pesada, conservándose la mutación R103S. En la cadena ligera, las mutaciones V23F y G24C se conservan también, pero está presente una mutación adicional en la posición 46. Ramos natural tiene un aspartato en esta posición, mientras que las células de la ronda 6 tienen una alanina. Se predicen cambios en esta posición que afectan la fijación del antígeno, ya que los restos en esta región contribuyen a CDR2 de la cadena ligera (figura 16). Parece probable que la mutación D46A es responsable del aumento observado en la fijación a la estreptavidina observada en las células de la ronda 6.

Ejemplo 6

Construcción de transgén que comprende secuencias que se dirigen a la hipermutación

Es conocido que determinados elementos de los loci del gen de Ig son necesarios para la dirección de los episodios de hipermutación *in vivo*. Por ejemplo, el potenciador del intrón y la región Ei/MAR de acoplamiento a la matriz se ha demostrado que desempeñan una función crítica (Betz *et al.*, 1994). Además, es conocido que el potenciador E3' en 3' es importante (Goyenechea *et al.*, 1997). Sin embargo, los autores han demostrado que estos elementos, aunque necesarios, no son suficientes para dirigir la hipermutación en un transgén.

En cambio, la provisión de Ei/MAR y E3' junto con el ADN del intron J_κ-C_κ adicional es suficiente para proporcionar hipermutabilidad. Se monta un transgén βG-C_κ uniendo un fragmento de KpnI-SpeI β-globina (que se extiende desde -104 con respecto al punto de partida de la transcripción de β-globina a +863 y tiene secuencias de restricción KpnI y SpeI artificiales en sus extremos) para un subfragmento de L_κΔ[3'FI] [Betz *et al.*, 1994] que se extiende desde el nucleótido 2314 en la secuencia de Max *et al.* [1981] a través de Ei/MAR, C_κ y E3', e incluye la eliminación de 3'FI.

La hipermutación se evalúa secuenciando los segmentos del transgén que son ampliados por PCR utilizando Pfu polimerasa. La región ampliada se extiende desde inmediatamente corriente arriba de la secuencia de iniciación de la transcripción hasta 300 nucleótidos corriente abajo de J_κ5.

Este transgén híbrido está bien dirigido para la mutación con las sustituciones de nucleótidos que se acumulan a una frecuencia similar a la encontrada en un transgén de Ig_κ normal. Este transgén es el más pequeño descrito hasta ahora que alista eficazmente la hipermutación y los resultados indican que las múltiples secuencias localizadas en alguna parte de la región incluyendo y flanqueado C_κ se combinan para alistar la hipermutación al extremo 5' del híbrido β-globina/Ig_κ.

La recuperación de la hipermutación por consiguiente puede ser dirigida solamente por las secuencias situadas hacia el extremo 3' del dominio de hipermutación. Sin embargo, el límite 5' del dominio de mutación en los genes de Ig normales en la proximidad del activador, algunos de 100 a 200 nucleótidos corriente abajo del punto de partida de la transcripción. Esta ubicación de límite 5' del dominio de mutación con respecto al punto de partida permanece incluso en el transgén βG-C_κ cuando el gen de β-globina proporciona tanto el activador como el conjunto del dominio de mutación. Estos resultados concuerdan con los descubrimientos hechos con otros transgenes que indican que es la posición del propio activador la que define el límite 5' del dominio de mutación.

La explicación más sencilla para el modo en que no alguno sino todos los elementos reguladores κ contribuyen a la recuperación de la mutación consiste en proponer que actúan trayendo un factor de preparación de la hipermutación en el complejo de iniciación de la transcripción. Por analogía con los estudios clásicos sobre potenciadores como elementos reguladores de la transcripción, los potenciadores de Ig_κ pueden actuar como reguladores de la hipermutación en una posición y independientemente de la orientación. De hecho, los datos obtenidos con el transgén βG-C_κ conjuntamente con los resultados anteriores en los que E3' se movía más cerca de C_κ [Betz *et al.*, 1994] pone de manifiesto que la actividad de E3' que potencia la hipermutación no es especialmente sensible a su posición u orientación con respecto al dominio de la mutación.

Normalmente Ei/MAR se sitúa hacia el extremo 3' del dominio de la mutación. Aunque la eliminación de Ei/MAR reduce drásticamente la eficacia del reconocimiento de la mutación, su reinstauración a una posición corriente arriba del activador (y por consiguiente fuera de la región transcrita) proporciona un rescate parcial de la mutación pero sin afectar aparentemente la posición del límite 5' del dominio de la mutación. La confirmación independiente de estos resultados se obtuvo en ratones transgénicos utilizando un segundo transgén *tk-neo::C_κ* en la que una unidad de transcripción *neo* (bajo el control del activador *tk* de VSH) está integrada en el exón de C_κ por reconocimiento génico en las células madre embrionarias [Zou, *et al.*, 1995]. En este ratón, después de la unión de V_κ-J_κ, el Ei/MAR de Ig_κ está flanqueado en ambos lados por los dominios de transcripción: el gen V corriente arriba y *tk::neo* corriente abajo. El gen *tk::neo* se amplía por RCP en linfocitos B del centro germinal clasificados de ratón homocigótico para la inserción de *neo*.

Para la inserción de *tk-neo* en ratones *tk-neo::C_κ*, la región ampliada se extiende desde los restos 607 a 1417 [numerados en el plásmido pMCNeo (registro U43611 del GenBank)] y la secuencia nucleotídica determinada desde la posición 629 hasta 1329. La frecuencia de la mutación de los cambios de posición de VJ_κ endógenos de ratos *tk-neo::C_κ* se determina utilizando una estrategia similar a la descrita en Meyer *et al.*, 1996. Los cambios de posición de VJ_{κ5} endógenos se amplían utilizando un cebador delantero de consenso FR3 de V_κ (GGACTGCAGTCAGGTTTCAGTGG-CAGTGGG) y un oligonucleótido L_κFOR [Gonzalez-Fernandez y Milstein, (1993) PNAS (EE.UU.) 90:9862-9866] que vuelve a cebar desde corriente arriba del grupo J_κ.

Aunque el nivel de mutación de *tk-neo* es bajo y ciertamente está menos eficazmente dirigido para la mutación que la región de franqueo 3' de los genes V_κ cambiados de posición en la misma población celular, parece que, como con los genes V normales, el dominio de mutación en la inserción del gen *neo* comienza un tanto sobre 100 nucleótidos corriente debajo de la secuencia de iniciación de la transcripción a pesar del hecho que Ei/MAR está corriente arriba del activador.

Por lo tanto, los transgenes capaces de dirigir la hipermutación en una extirpe celular de hipermutación constitutiva pueden construirse utilizando Ei/MAR, E3' y los elementos reguladores tales como los definidos en la presente memoria hallados corriente abajo de J_k . Además, los transgenes pueden construirse mediante la sustitución de la inserción en los genes V endógenos, como el caso de los ratones *tk-neo::C_k* o mediante la conexión de una secuencia de codificación deseada con el intrón J_k , como en el caso del transgén $\beta G-C_k$.

Referencias

- Adetugbo, K., Milstein, C. and Secher, D.S. (1977). Molecular analysis of spontaneous somatic mutants. *Nature* 265, 299-304.
- Bahler, D.W. and Levy, R. (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: Evidence for antigen selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6770-6774.
- Bass, S., R. Greene, and J.A. Wells. (1990). Hormone Phage: An Enrichment Method for Variant Proteins With Altered Binding Properties. *Proteins*. 8, 309-314.
- Braeuninger, A., Küppers, R., Strickler, J.G., Wacker, H.-H., Rajewsky, K. and Hansmann, M.-L. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9337-9342.
- Berek, C. and Milstein, C. (1988). The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol. Rev.* 105, 5-26.
- Betz, A.G., Neuberger, M.S. and Milstein, C. (1993). Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol. Today* 14, 405-411.
- Betz, A. G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T. and Neuberger, M. S., *Cell* 1994, 77: 239-248.
- Bonfield, J.K., Smith, K.F. and Staden, R. (1995). A new DNA-sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23, 4992-99.
- Brüggemann, M., Radbruch, A. and Rajewsky, K. (1982). Immunoglobulin V region variants in hybridoma cells. I. Isolation of a variant with altered idiotypic and antigen binding specificity. *EMBO J.* 1, 629-634.
- Capizzi and Jameson, (1973) *Mutat. Res.* 17:147-8.
- Chapman, C.J., Mockridge, C.I., Rowe, M., Rickinson, A.B. and Stevenson, F.K. (1995). Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intracлонаl heterogeneity. *Blood* 85, 2176-2181.
- Chapman, C.J., Zhou, J.X., Gregory, C., Rickinson, A.B. and Stevenson F.K. (1996). VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intracлонаl heterogeneity and a role for antigen selection. *Blood* 88, 3562-3568.
- Chapman, K.B. and Szostak, J.W. (1994) *Curr. op. Struct. Biol.*, 4, 618-622.
- Chui, Y.-L., Lozano, F., Jarvis, J.M., Pannell, R. and Milstein, C. (1995). A reporter gene to analyse the hypermutation of immunoglobulin genes. *J. Mol. Biol.* 249, 555-563.
- Clackson, T. and Wells, J.A. (1994) *Trends Biotechnol.* 12, 173-84.
- Coffino, P. and Scharff, M.D. (1971). Rate of somatic mutation in immunoglobulin production by mouse myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 219-223.
- Cull, M.G., Miller, J.F. and Schatz, P.J. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1865-9.
- Denépoux, S., Razanajaona, D., Blanchard, D., Meffre, G., Capra, J.D., Banchereau, J and Lebecque, S. (1997). Induction of somatic mutation in a human B cell line *in vitro*. *Immunity* 6, 35-46.
- Drake, J.W. (1998) *Genetics* 148:1667-1686.
- Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) *Nature*, 346, 81822.
- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. and Yarus, M. (1995) *Annu Rev Biochem*, 64, 763-97.

- Goossens, T., Klein, U. and Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogenic translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2463-2468
- 5 Goyenechea, B., Klix, N., Yélamos, J., Williams, G. T., Riddell, A., Neuberger, M. S. and Milstein, C., *EMBO J.* 1997, 16, in the press.
- Green, N.S., Lin, M.M. and Scharff, M.D. (1998). Immunoglobulin hypermutation in cultured cells. *Immunol. Rev.* 162, 77-87.
- 10 Green, R. and Szostak, J.W. (1992) *Science*, 258, 1910-5.
- Jain, R., Roncella, S., Hashimoto, S., Carbone, A., Franco di Celle, P., Foa, R., Ferrarini, M and Chiorazzi, N. (1994). A potential role for antigen selection in the clonal evolution of Burkitt's lymphoma. *J. Immunol.* 153, 45-52.
- 15 Jolly, C.J., Klix, N. and Neuberger, M.S. (1997). Rapid methods for the analysis of immunoglobulin gene hypermutation: application to transgenic and gene targeted mice. *Nucleic Acids Res.* 25, 1913-1919.
- 20 Jolly, C.J., Wagner, S.D., Rada, C.A., Klix, N., Milstein, C. and Neuberger, M.S. (1996). The targeting of somatic hypermutation. *Semin. Immunol.* 8, 159-168.
- Joyce, G.F. (1994) *Curr. op. Structural Biol.*, 4, 331-336.
- 25 Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J. and Mumford, D. (1975). An EBV negative cell line established from a American Burkitt lymphoma; receptor characteristics, EBV infectability and permanent conversion into EBVpositive sublines by *in vitro* infection. *Intervirology* 5, 319-334.
- Klix *et al.*, (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:317-326.
- 30 Lundberg, K.S., *et al.*, (1991) *Gene* 108:1-6.
- Luria and Delbreck., (1943) *Genetics* 28:491-511
- 35 McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990) *Nature*, 348, 552-4.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W. and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus haemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3180-3184.
- 40 Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9022-6.
- Matthias, *et al.*, (1989) *NAR* 17, 6418.
- 45 Max, E. E., Maizel, J. V. and Leder, P., *J. Biol. Chem.* 1981, 256: 5116-5120.
- Moore, M.J. (1995) *Nature*, 374, 766-7.
- Neuberger, M.S. and Milstein, C. (1995). Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 248-254.
- 50 Parham, P. (ed). (1998). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Immunological Reviews*, Vol. 162 (Copenhagen, Denmark: Munksgaard).
- Ratech, H. (1992). Rapid cloning of rearranged immunoglobulin heavy chain genes from human B-cell lines using anchored polymerase chain reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 1260-1263
- 55 Rogozin, I.B. and Kolchanov, N.A. (1992). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 1171, 11-18.
- 60 Sharpe *et al.*, (1991) *EMBO J.* 10:2139-2145.
- Smith, G.P. (1985) *Science*, 228, 1315-7.
- Tomlinson, I.M. (1997). V Base database of human antibody genes. Medical Research Council, Centre for Protein Engineering, UK. <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/Tuerk>, C. and Gold, L. (1990) *Science*, 249, 505-10.
- 65 Wabl, M., Burrows, P.D., von Gabain, A. and Steinberg, C.M. (1985). Hypermutation at the immunoglobulin heavy chain loci in a pre-B-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 479-482.

Wagner, S.D., Milstein, C. and Neuberger, M.S. (1995). Codon bias targets mutation. *Nature* 376, 732.

Weill, J.-C. and Reynaud, C.-A. (1996). Rearrangement/hypermutation/gene conversion: when, where and why? *Immunol. Today* 17, 92-97.

Wilson, P.C., de Boutellier, O., Liu, Y.-J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D. and Pascual, V. (1998). Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J. Exp. Med.* 187, 59-70.

Wu, H., Pelkonen, E., Knuutila, S and Kaartinen M. (1995). A human follicular lymphoma B cell line hypermutates its functional immunoglobulin genes *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 25, 3263-3269.

Wu, H., and Kaartinen, M., (1995) *Scand. J. Immunol.* 42:52-59.

Zhu, M., Rabinowitz, J.L., Green, N.S., Kobrin, B.J. and Scharff, M.D. (1995) A well-differentiated B cell line is permissive for somatic mutation of a transfected immunoglobulin heavy-chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2810-2814.

Zou, X., Xian, J., Popov, A. V., Rosewell, I. R., Muller, M. and Brüggemann, M., Eur. J. Immunol. 1995. 25: 2154-62.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un producto génico que presenta una actividad deseada, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
 - a) expresión *in vitro* de un ácido nucleico que codifica dicho producto génico ligado funcionalmente a las secuencias de control que dirigen la hipermutación en una población de células linfoides, en el que dicha población clónica de células linfoides pueden alterar una o más secciones específicas del ácido nucleico sin el requisito para la estimulación externa;
 - b) identificar una célula o células en el interior de dicha población clonal de células linfoides que expresa un producto génico mutado que presenta la actividad deseada; y
 - c) determinar una o más poblaciones clonales de células a partir de la célula o células identificadas en la etapa (b) y seleccionar a partir de dichas una o más poblaciones clonales una población de célula o células que expresan un producto génico que presenta una actividad deseada mejorada;en el que las etapas (b) y (c) se repiten de manera iterativa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas poblaciones clonales de células de la etapa (c) se seleccionan determinando la presencia de hipermutación en el ácido nucleico que codifica dicho producto génico de la célula o células.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula o células dirigen la hipermutación constitutiva a una secuencia de codificación de la región del gen V endógeno.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas secuencias de control que dirigen la hipermutación se seleccionan de entre las secuencias que se producen corriente abajo de un grupo del gen J.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las secuencias de control comprenden elementos Ei/MAR, regiones flanqueantes C- κ y E3' definido según Klix *et al.*, (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:317-326.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico que codifica dicho producto génico ligado funcionalmente a las secuencias de control que dirigen la hipermutación es una secuencia de codificación exógena heteróloga insertada en la célula o células.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que una secuencia de codificación de la región del gen V endógeno se sustituye por una secuencia de codificación exógena heteróloga.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho producto génico es una inmunoglobulina.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho producto génico es una proteína que se une al ADN.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la actividad deseada es una actividad de unión.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el producto génico es una enzima.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha identificación de la etapa (b) se basa en FACS.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha identificación de la etapa (b) se basa en la unión a perlas magnéticas.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha identificación de la etapa (b) se basa en la selección por afinidad.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha identificación de la etapa (b) se basa en la actividad enzimática.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicha selección de la etapa (c) se basa en FACS.

ES 2 336 982 T3

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicha selección de la etapa (c) se basa en la unión a perlas magnéticas.

5 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicha selección de la etapa (c) se basa en la selección por afinidad.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicha selección de la etapa (c) se basa en la actividad enzimática.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

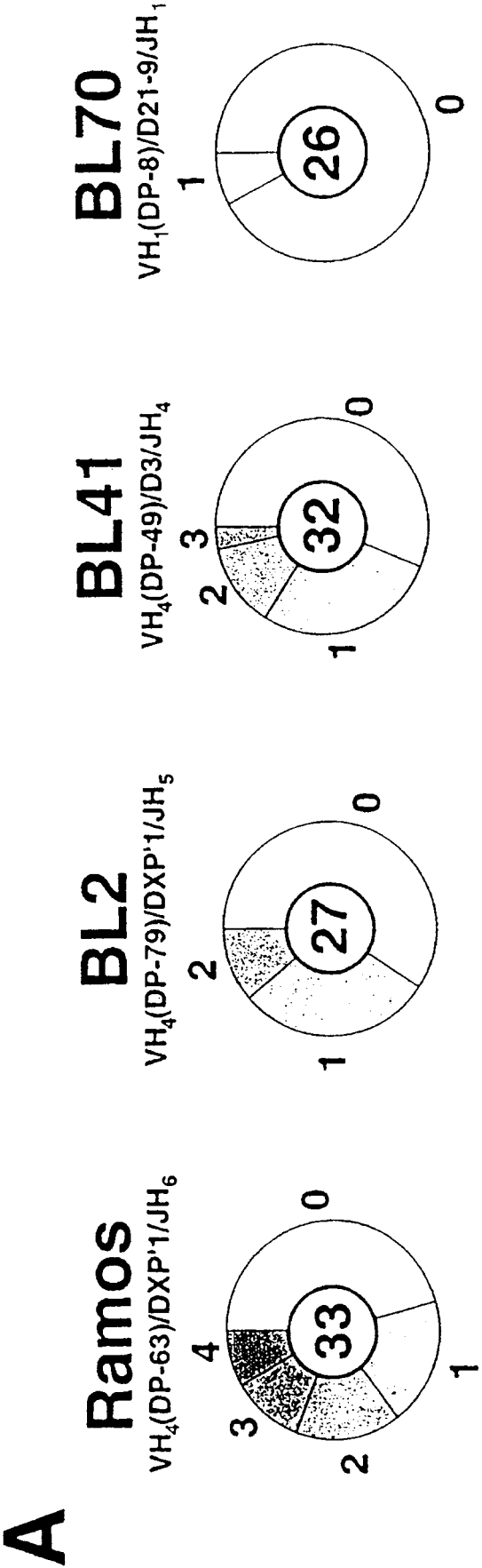


FIG. 1

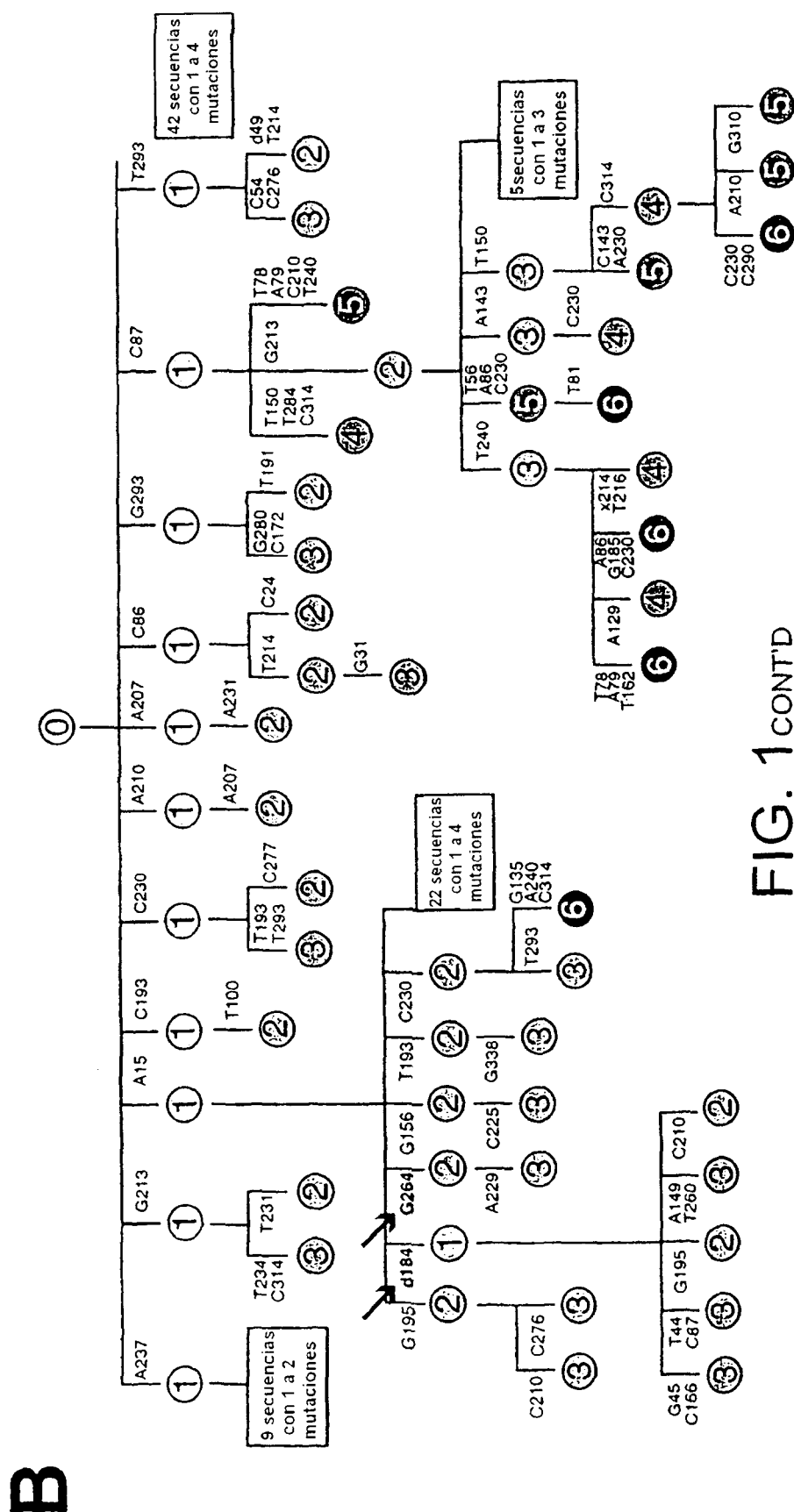
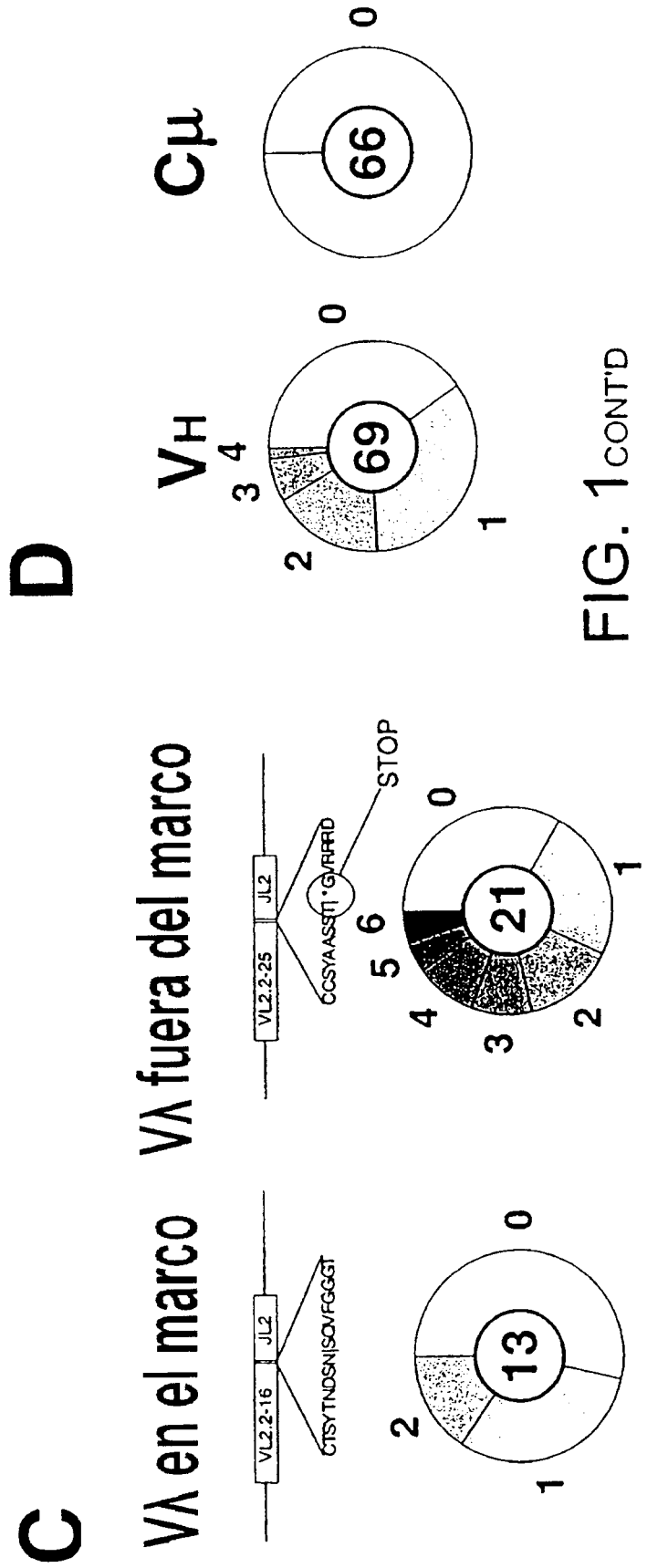
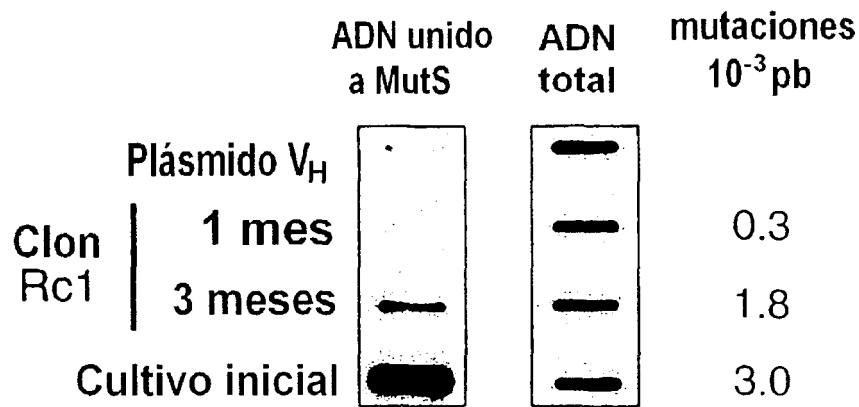


FIG. 1 CONT'D

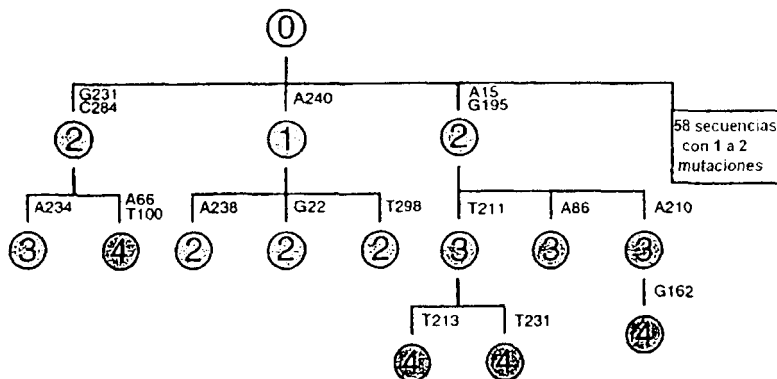


A

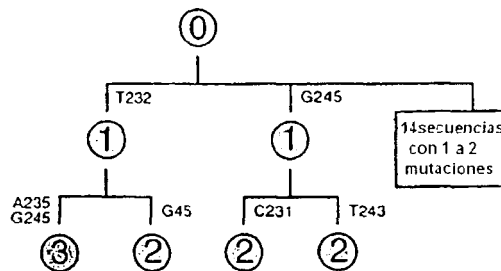


B

Clon Rc13
 0.24×10^{-4} mutn.bp⁻¹.div⁻¹



Clon Rc14
 0.22×10^{-4} mutn.bp⁻¹.div⁻¹



Clon Rc1
 0.27×10^{-4} mutn.bp⁻¹.div⁻¹

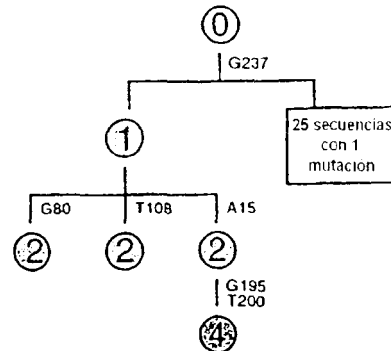
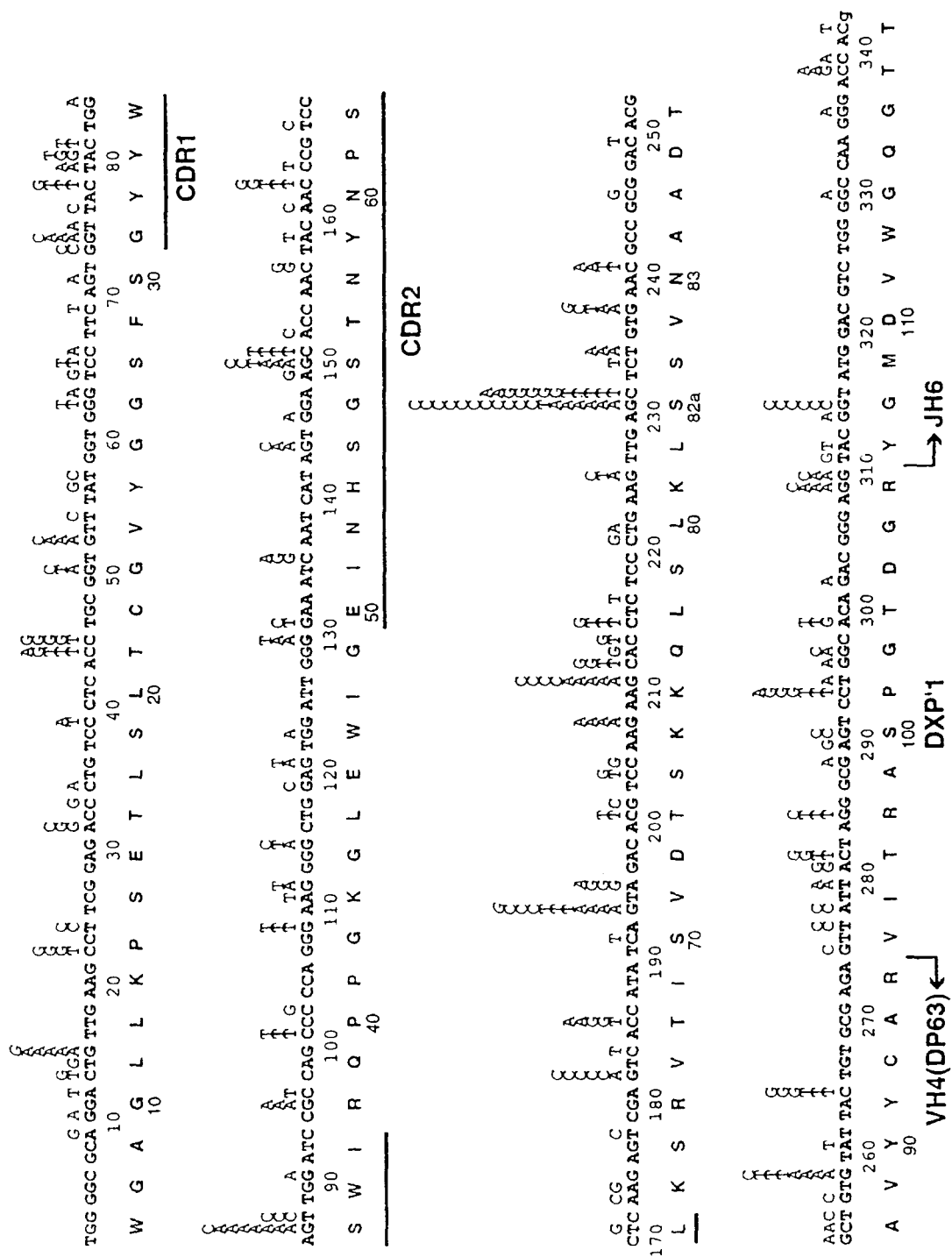
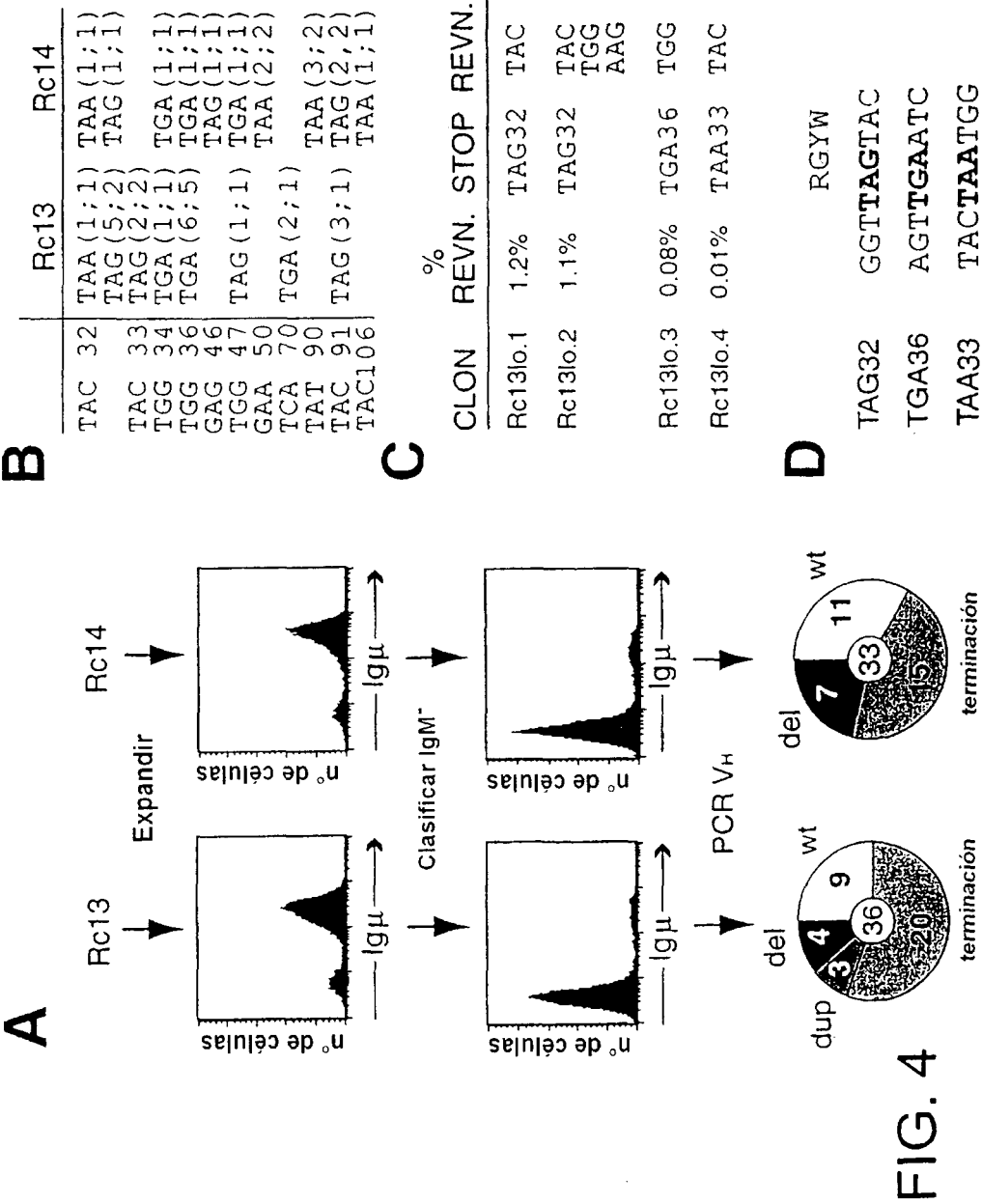


FIG. 2





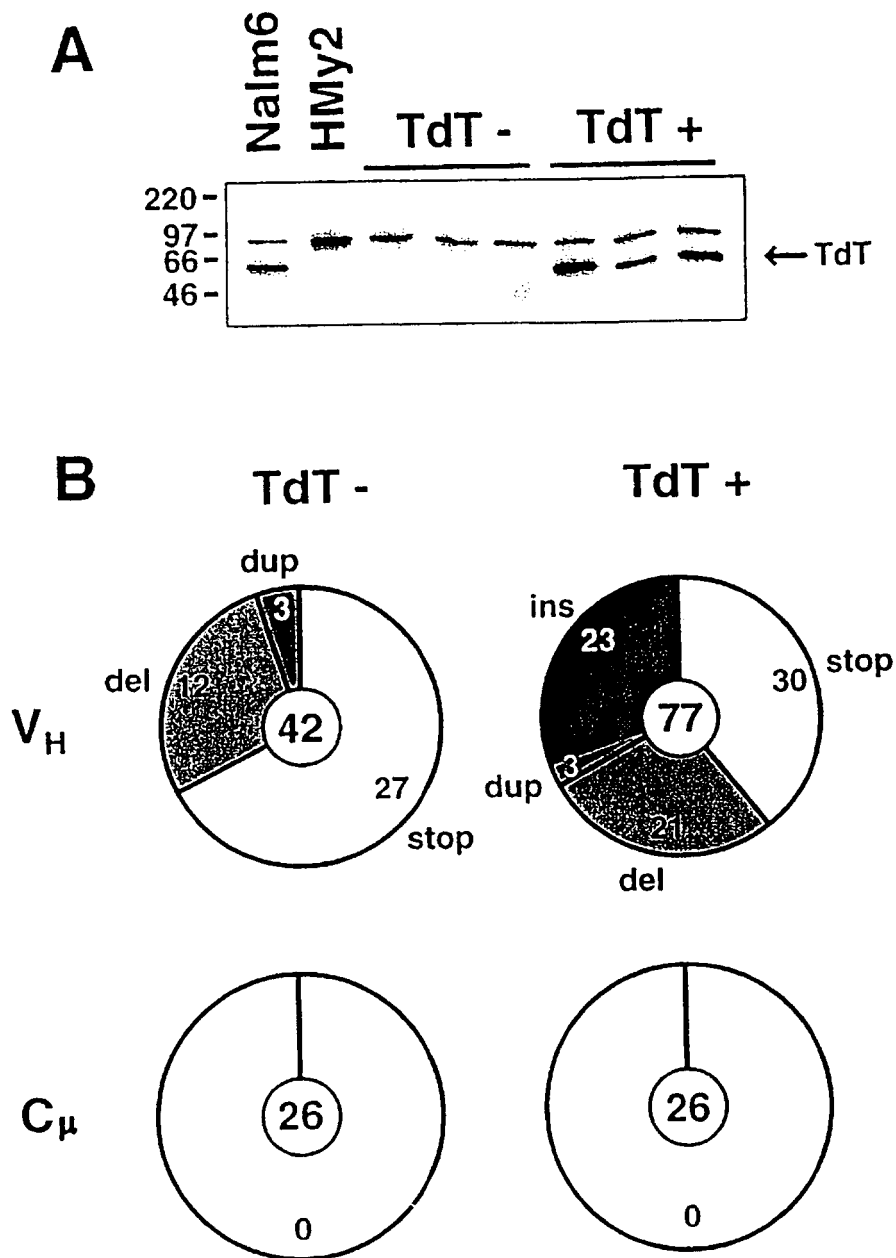


FIG. 5

TdT positivo

[illegible]

FIG. 6

1/1 31/11
TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC GGT GTT TAT GGT
W G A G L K P S E T L S L T C G V Y G

61/21 91/31
GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG
G S F S G Y Y W S W I R Q P P G K G L E
AGT
S

121/41 151/51
TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA
W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R

181/61 211/71
GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAG CAG CTC TCC CTG AAG TTG AGC TCT GTG AAC
V T I S V D T S K K H L S L K L S S V N
ATC CAC
M H

241/81 271/91
GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTT ATT ACT AGG GCG AGT CCT GGA ACA
A A D T A V Y Y C A R V I T R A S P G T
TCG CAT GGC
S H G

301/101 331/111
GAC GGG AGG TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
D G R Y G M D V W G Q G T T
GTT
V

FIG. 7

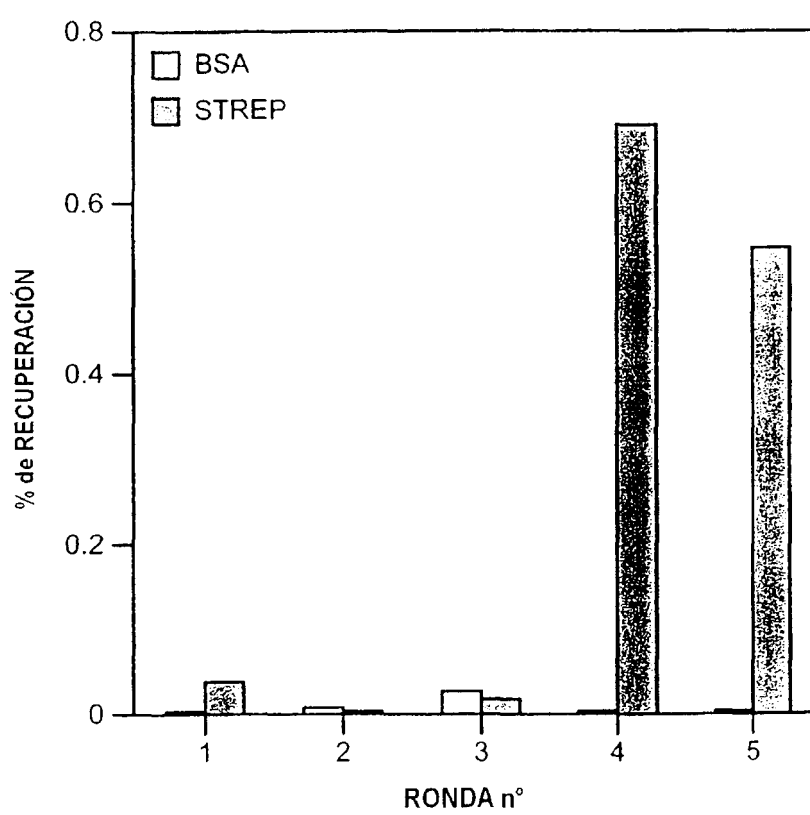


FIG. 8

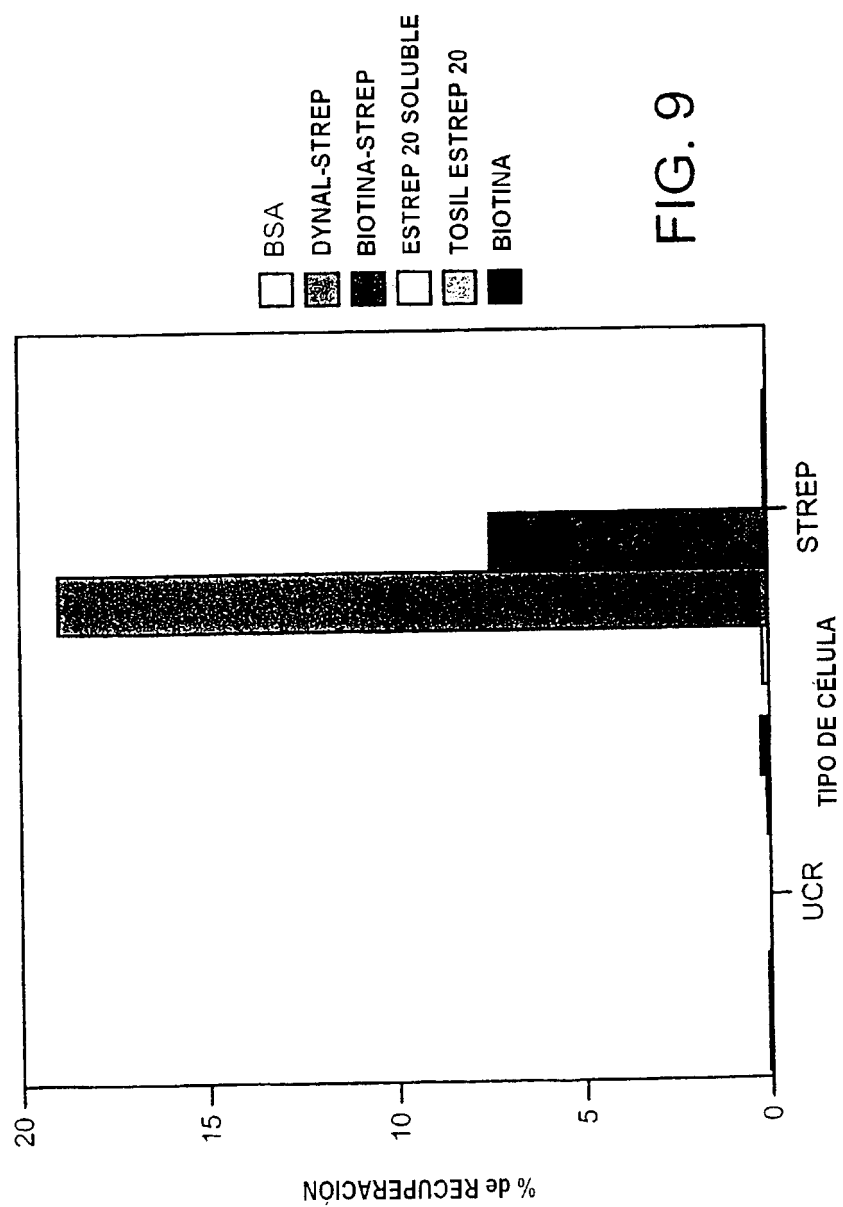


FIG. 9

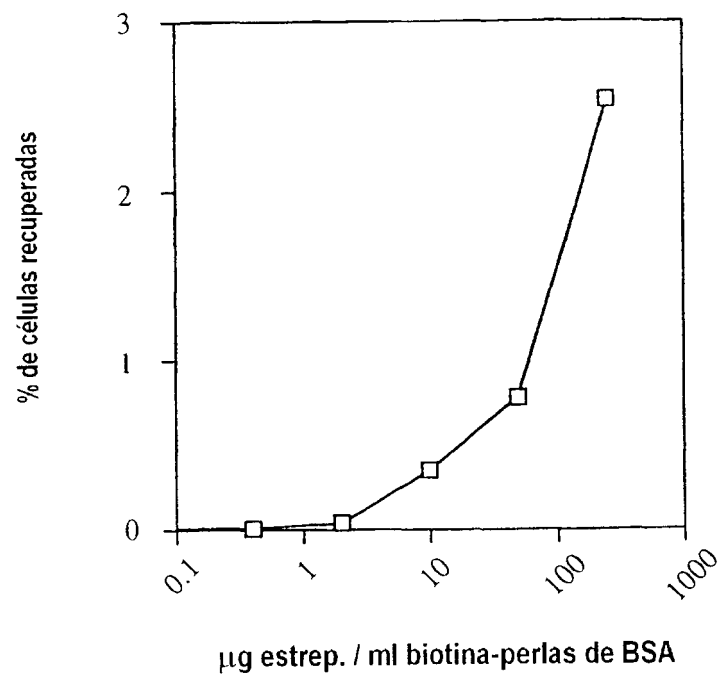


FIG. 10

FIG. 11

VH

1/1 31/11
TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG AGC ACC CTG TCC CTC ACC TGC GGT GTT TAT GGT
W G A G L L K P S E T L S L T C G V Y G

61/21 91/31
GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG
G S F S G Y Y W S W I R Q P P G K G L E
GGA AGT
G S
ATT
I

121/41 151/51
TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA
W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R

181/61 211/71
GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAG CAG CTC TCC CTG AAG TTG AGC TCT GTG AAC
V T I S V D T S K K H L S L K L S S AAC
CAC
H N

241/81 271/91
GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTT ATT ACT AGG GCG AGT CCT GGA ACA
A A D T A V Y Y C A R V I T R A S P G T

301/101 331/111
GAC GGG AGG TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
D G R Y G M D V W G Q G T T
AGC
S

VL

1/1 31/11
 CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC
 P A S V S G S P G S I T I S C T G T S
 TAT
 Y

61/21 91/31
 AGT GAC GTT GGT GGT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA AAC CCA GGC AAA GCC CCC
 S D V G G Y N Y V S W Y Q Q N P G K A P
 TTT TGT
 F C

121/41 151/51
 AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG ATT TCT AAT CGC TTC TCT GGC
 K L M I Y D V S N R P S G I S N R F G S
 AAT
 N CGA TTA
 R L

181/61 211/71
 TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAC GAC GAG GCT
 S K S G N T A S L T I S G L Q A D D E A
 ATC
 I

241/81 271/91
 GAT TAT TAC TGC ACC TCA TAT ACA AAC GAC AGC AAT TCT CAG GTA TTC GGC GGA GGG ACC
 D Y Y C T S Y T N D S N S Q V F G G T
 ACT
 T

FIG. 11 CONTD

FIG. 12

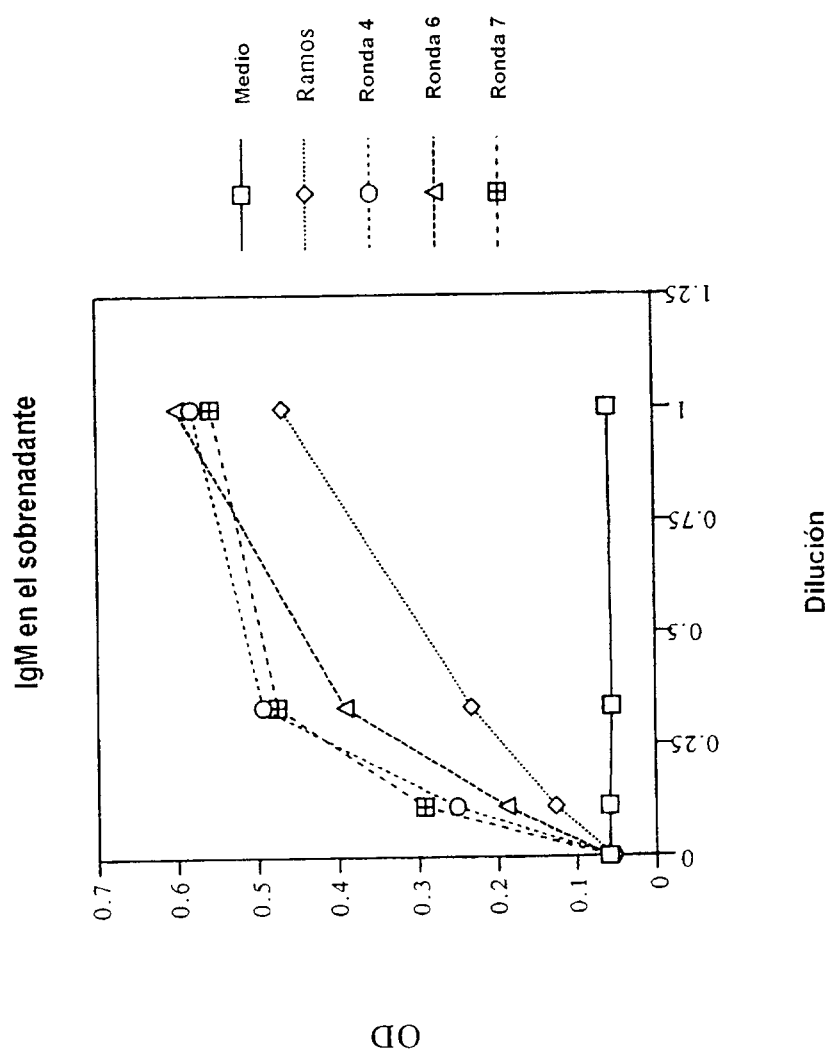


FIG. 13

Fijación en estreptavidina de sobrenadantes :ELISA

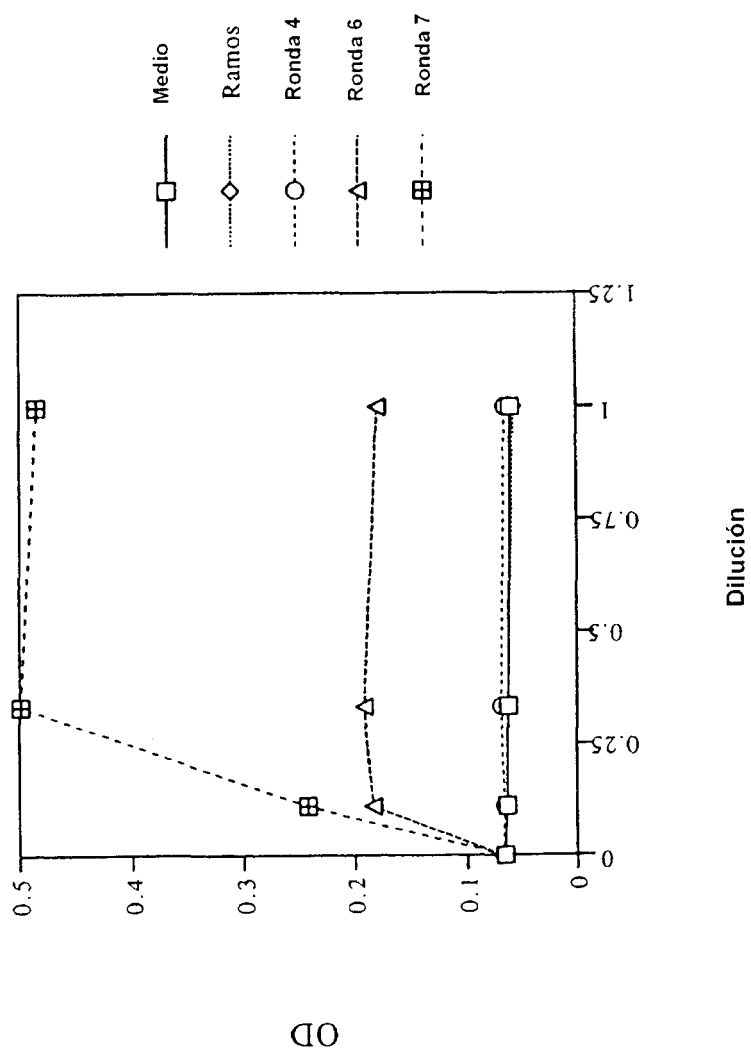
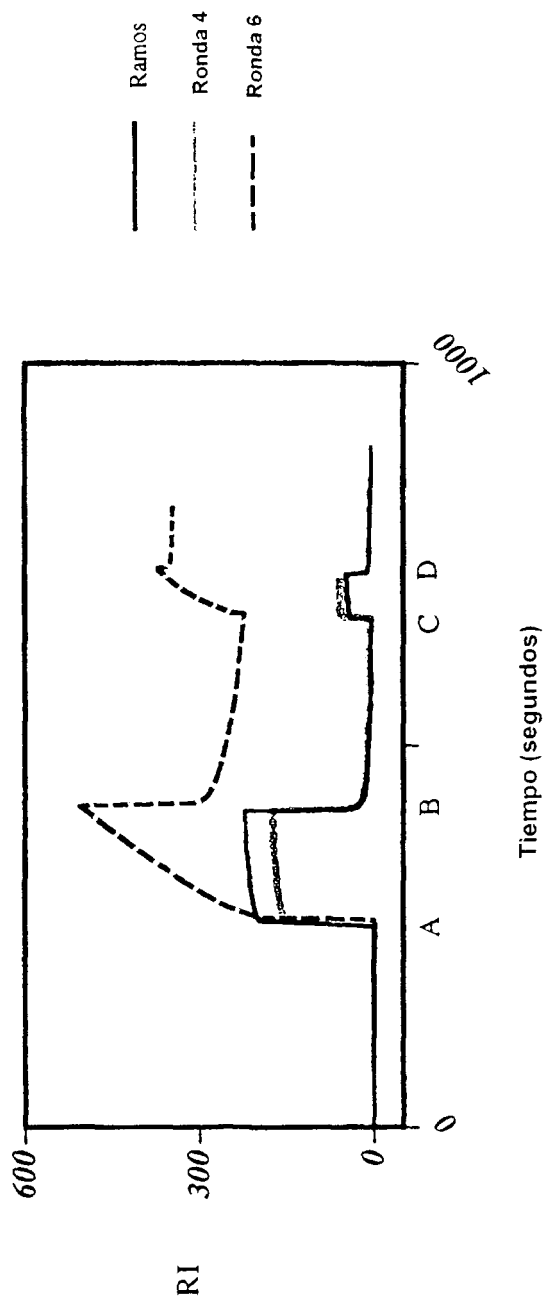


FIG. 14

Fijación en estreptavidina de sobrenadantes: Biacore



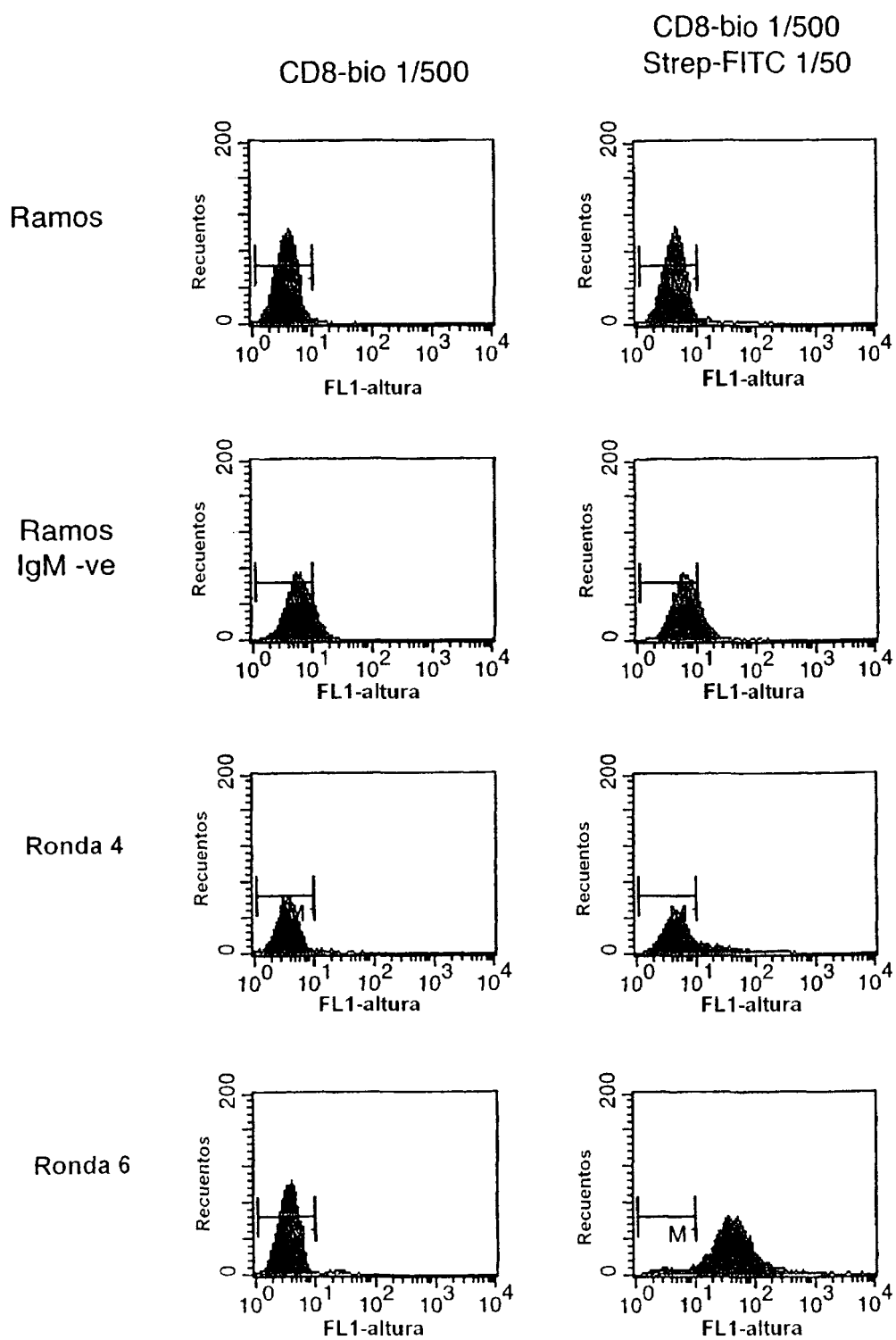


FIG. 15

FIG. 16

VH

1/1 31/11
TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC GGT GTT TAT GGT
W G A G L L K P S E T L S L T C G V Y G

61/21 CDR1 91/31
GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG
G S F S G Y Y W S W I R Q P P G K G L E

121/41 CDR2 151/51
TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA
W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R

181/61 211/71
GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAG CAG CTC TCC CTG AAG TTG AGC TCT GTG AAC
V T I S V D T S K K H L S L K L S S V N

241/81 271/91 DJ
GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTT ATT ACT AGG GCG AGT CCT GGA ACA
A A D T A V Y Y C A R V I T R A S P G T

301/101 331/111
GAC GGG AGG TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
D G R Y G M D V W G Q G T T
AGC
S

VL

1/1	31/11	CDR1
CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC		
P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S		
61/21	91/31	
AGT GAC GTT GGT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA AAC CCA GGC AAA GCC CCC		
S D V G G Y N Y V S W Y Q Q N P G K A P		
TTT TGT		
F C		
121/41	151/51	
AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG ATT TCT AAT CGC TTC TCT GGC		
K L M I Y D V S N R P S G I S N R F G S		
GCT		
A		
181/61	211/71	
TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAC GAC GAG GCT		
S K S G N T A S L T I S G L Q A D D E A		
241/81	271/91	
GAT TAT TAC TGC ACC TCA TAT ACA AAC GAC AGC AAT TCT CAG GTA TTC GGC GGA GGG ACC		
D Y Y C T S Y T N D S N S Q V F G G T		

FIG. 16CONTD