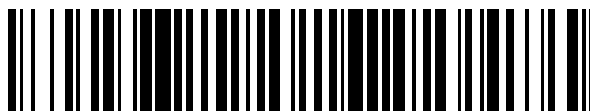


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 025**

51 Int. Cl.:

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2009 PCT/US2009/051716**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010 WO10011944**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2009 E 09801086 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2316030**

54 Título: **Métodos de cribado de proteínas**

30 Prioridad:

25.07.2008 US 83813 P

19.08.2008 US 90111 P

16.04.2009 US 170029 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.04.2020

73 Titular/es:

**WAGNER, RICHARD W. (100.0%)
24 Coolidge Avenue
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**WAGNER, RICHARD, W y
LITOVCHICK, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 752 025 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de cribado de proteínas

5 **Solicitudes relacionadas**

10 **[0001]** Esta solicitud es una solicitud de continuación de PCT/US2009/051716, presentada el 24 de julio de 2009, y que reclama prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 61/083813, presentada el 25 de julio de 2008, Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 61/090,111, presentada el 19 de agosto de 2008, y la Solicitud provisional de Estados Unidos No. 61/170029, presentada el 16 de abril de 2009.

Antecedentes

15 **[0002]** Se entiende bien que, en el uso de tecnologías de visualización y selección, el acceso a una mayor diversidad permite una selección más eficaz de moléculas con la mayor afinidad, especificidad, estabilidad y/u otras características deseables.

20 **[0003]** Métodos anteriores que se han desarrollado incluyen la presentación de fagos, presentación de ribosomas, presentación de CIS, y presentación de ARNm. Recientemente, ha habido un mayor interés en identificar moléculas utilizando el cribado in vivo (J Control Release. 2003 Agosto 28; 91 (1-2): 183-6). Este enfoque ha sido posible utilizando la presentación de fagos, pero adolece de la diversidad limitada que ofrecen las tecnologías de presentación de fagos. La visualización de ribosomas o ARNm no funcionaría para esta aplicación debido a la inestabilidad de las especies de ARN. Por lo tanto, el desarrollo de fusiones de ADN-proteína sería altamente deseable, debido a la mayor estabilidad de la especie.

25 **[0004]** Se han descrito tres tipos de fusiones de ADN-proteína. La visualización CIS es un método en el que se utiliza la transcripción/traducción in vitro acoplada para generar una proteína de unión a ADNds que se une covalentemente al ADN a medida que se está transcrito y traducido (PNAS, 101 (9): 2806-2810). Sin embargo, una de las principales limitaciones de esta tecnología es que la proteína sintetizada puede unirse a cualquier ADN vecino que esté cerca durante el proceso de transcripción/traducción, lo que resulta en fusiones mal etiquetadas. El segundo método es el de Kurz y Lohse (Chembiochem. 2001 Sep 3; 2 (9): 666-72). Este método implica la formación de aductos covalentes con ARNm utilizando una especie multifuncional que puede unirse covalentemente con la proteína traducida, crear una pausa ribosómica en el aducto covalente en el ARN y servir como cebador para la transcripción inversa. Una limitación de este método es la ineficiencia de la etapa de enlace covalente con ARN usando psoraleno. El tercer método es el de Yonezawa et al. (Nucleic Acids Res. 2003 1 de octubre; 31 (19): e118.) En este método, el ADN que codifica estreptavidina y una región de diversos péptidos se biotinila, se coloca en una microesfera sintética con maquinaria de traducción y se traduce de manera que la estreptavidina (tetramérica) se unirá al ADN biotinilado. La limitación de este método es que la especie resultante es tetramérica, lo que puede ser problemático para las selecciones de afinidad debido a múltiples especies de unión en una partícula (efecto de unión).

40 **[0005]** Biyani et al. (2006) describen la traducción en fase sólida y la fusión de ARN y proteínas: un enfoque para el control de calidad de plegamiento y la inmovilización directa de proteínas utilizando ARNm anclado (Nucleic Acids Research vol. 34, nº 20, página E140).

45 **[0006]** Yonezawa et al. (2004) describen una muestra de ADN de proteínas biológicamente activas para la selección de proteínas in vitro (J Biochem vol. 135, páginas 285-288).

50 **[0007]** Sato y Yanagawa (2006) describen la tecnología de puomicina para la evolución in vitro y la exploración de proteomas (Viva Origino, Seimei No Kigen Oyobi Shinka Gakkai, JP, vol. 34, no. 4, páginas 148-154).

[0008] Doi et al., (1999) describen un sistema de fusión de proteína-ADN para la selección de bibliotecas combinatorias de proteínas in vitro (FEBS Letters, vol.457 (2): 227-230).

55 **[0009]**. Shields et al. (2002) describen una falta de fucosa en oligosacárido ligado a N IgG1 humana mejora la unión a FcγRIIIa humanos y la toxicidad celular dependiente de anticuerpo (J Biol Chem vol.277 (30): 26733-26740).

60 **[0010]** En la presente memoria se describe un método simple, eficiente para la generación de fusiones de proteína de ácido nucleico se requiere que puede emplear unión no covalente entre el ácido nucleico y la proteína, y que permitirá la formación de fusiones de ADN-proteína.

Resumen de la invención

[0011] la presente invención proporciona un complejo que comprende una pantalla X:

65 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de polipéptido, en donde la molécula de ácido nucleico se une covalentemente a un primer ligando de alta afinidad;

- (b) un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico; y
- (c) un receptor de ligando unido a un receptor de péptido, en el que el receptor de péptido está unido covalentemente al extremo C del polipéptido,

5 y en el que el primer ligando de alta afinidad está unido al receptor de ligando, y el polipéptido está no covalentemente unido a la molécula de ácido nucleico.

10 **[0012]** La presente descripción proporciona composiciones y métodos para seleccionar y evolucionar propiedades deseadas de proteínas y ácidos nucleicos. En diversas realizaciones, la presente invención incluye pequeñas moléculas unidas a ácido nucleico o ácido nucleico modificado. Otras realizaciones de la divulgación incluyen métodos para producir polipéptidos, incluidos péptidos con aminoácidos modificados, ensayos para permitir la selección de miembros individuales de la población que tienen propiedades deseadas, y métodos para generar nuevas variaciones de polipéptidos con propiedades mejoradas.

15 **[0013]** En un aspecto, la divulgación proporciona un complejo heterobifuncional que comprende:

- (a) una primera molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido;
- (b) un polipéptido codificado por la primera molécula de ácido nucleico; y
- (c) una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleica complementaria a una porción de la primera molécula de ácido nucleico,

20 en la que la primera molécula de ácido nucleico está unida a la segunda molécula a través del emparejamiento de bases de ácido nucleico complementario, y en donde la segunda molécula de ácido nucleico se une de forma no covalente al polipéptido.

25 **[0014]** En algunas realizaciones, este complejo heterobifuncional comprende además:

- (a) un ligando de alta afinidad unido covalentemente a la segunda molécula de ácido nucleico; y
- (b) un receptor de ligando unido a un receptor de péptido,

30 en el que el ligando de alta afinidad está unido al receptor de ligando y el receptor de péptido está unido covalentemente al polipéptido. En algunas realizaciones, este complejo heterobifuncional comprende además un segundo ligando de alta afinidad, en el que el segundo ligando de alta afinidad está unido covalentemente al receptor peptídico, y en el que el segundo ligando de alta afinidad está unido al receptor de ligando. En algunas realizaciones, el receptor de péptidos en este complejo heterobifuncional está unido al segundo ligando de alta afinidad a través de un conector. En una realización preferida, el conector comprende polietilenglicol. En otra realización preferida, el conector comprende además un conector de ácido polisialico. En algunas realizaciones, el receptor de ligando en este complejo heterobifuncional está unido covalentemente al receptor de péptido.

40 **[0015]** En algunas realizaciones, este complejo heterobifuncional comprende además:

- (a) un receptor de ligando unido covalentemente a la segunda molécula de ácido nucleico; y
- (b) un ligando de alta afinidad unido a un receptor de péptido,

45 en el que el receptor de ligando está unido al ligando de alta afinidad y el receptor de péptido está unido covalentemente al extremo C del polipéptido.

50 **[0016]** En otras realizaciones, este complejo heterobifuncional comprende además una tercera molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a una porción de la segunda molécula de ácido nucleico, en el que la tercera molécula de ácido nucleico se une a la segunda molécula de ácido nucleico a través del emparejamiento de base de ácido nucleico complementario, en el que la tercera molécula de ácido nucleico está unida covalentemente a un receptor peptídico, y en el que el receptor peptídico está unido covalentemente al polipéptido.

55 **[0017]** En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico en los complejos descritos anteriormente es una molécula ramificada de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico en los complejos descritos anteriormente es capaz de actuar como un cebador para la transcripción inversa de la primera molécula de ácido nucleico.

60 **[0018]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un complejo de pantalla X (por ejemplo, un complejo de polipéptido de ácido nucleico) que comprende:

- (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido, unido covalentemente a un primer ligando de alta afinidad;
- (b) un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico;
- (c) un receptor de ligando unido a un receptor de péptido,

en el que el ligando de alta afinidad está unido al receptor de ligando y el receptor de péptido está unido covalentemente al extremo C del polipéptido.

5 **[0019]** En algunas realizaciones, el aceptor de ligando de este complejo de pantalla X está unido covalentemente al aceptor de péptidos. En algunas realizaciones, este complejo de pantalla X comprende además un segundo ligando de alta afinidad, en el que el segundo ligando de alta afinidad está unido covalentemente al receptor peptídico, y en el que el segundo ligando de alta afinidad está unido al aceptor de ligando.

10 **[0020]** En otro aspecto, esta descripción proporciona un complejo de pantalla X que comprende:

- (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido, unido covalentemente a un primer ligando de alta afinidad;
- 15 (b) un primer aceptor de ligando unido covalentemente a un segundo ligando de alta afinidad; y
- (c) un polipéptido codificado por la primera molécula de ácido nucleico, en el que el polipéptido comprende un segundo receptor de ligando,

en el que el primer ligando de alta afinidad está unido al primer receptor de ligando, y el segundo ligando de alta afinidad está unido al segundo ligando de aceptor.

20 **[0021]** En algunas realizaciones, el primer o segundo ligando de alta afinidad unido a los complejos descritos anteriormente es la biotina.

25 **[0022]** En algunas realizaciones, el primer o segundo ligando de alta afinidad unido a los complejos descritos anteriormente se seleccionan de entre el grupo que comprende FK506, metotrexato, PPI-2458, biotina, hirudina, ZFVp(O)F, gluoresceína-biotina, ABD (dominio de unión a albúmina), 18 bp de ADN, ARNasa A, cloroalcanos, arilo (acetato de beta-amino) cetonas, y proteína A.

30 **[0023]** en algunas realizaciones, el primer o segundo aceptor de ligando en los complejos descritos anteriormente se selecciona de entre el grupo que comprende FKBP12, dihidrofolato reductasa, metionina aminopeptidasa, estreptavidina dimérica, estreptavidina tetrámero, trombina, carboxipeptidasa, monovalente Ab, HSA (albúmina), dedo Zn, hRI (inhibidor de la RNasa), deshalogenasa de haloalcano mutada, haloTag y sortasa.

35 **[0024]** En algunas realizaciones, el primer o segundo aceptor de ligando en los complejos descritos anteriormente es estreptavidina.

[0025] En algunas realizaciones, el polipéptido descrito anteriormente se elige del grupo que comprende un anticuerpo, un dominio VH, un dominio VL, un fragmento Fab, un anticuerpo de cadena sencilla, un nanocuerpo, un cuerpo, una adnectina, un aficuerpo, un DARPin, una anticalina, un avímero, un dominio ¹⁰F_n3 y un versacuerpo.

40 **[0026]** En otro aspecto, esta descripción proporciona un complejo de pantalla X que comprende:

- (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido, unida covalentemente a un ligando; y
- 45 (b) un polipéptido codificado por la primera molécula de ácido nucleico, en donde el polipéptido comprende un aceptor de ligando,

en donde el ligando está unido al aceptor de ligando.

50 **[0027]** En algunas realizaciones, el ligando unido al complejo de pantalla X es FK506 y el aceptor de ligando en los complejos de ácido nucleico-polipéptido es el dominio de unión a FK506 de FKBP.

[0028] En algunas realizaciones, se selecciona la primera molécula de ácido nucleico unida a los complejos descritos anteriormente del grupo que consiste en ARNss, ADNss, ADNss/ARN híbrido ADNds y ADNds/ARN híbrido.

55 **[0029]** En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el polipéptido de la primera molécula de ácido nucleico unida a los complejos descritos anteriormente no contiene un codón de detención en el marco.

[0030] En algunas realizaciones, el polipéptido descrito anteriormente es una proteína de unión. En una realización preferida, la proteína de unión es el dominio VH o VL de un anticuerpo.

[0031] En algunas realizaciones, los complejos de ácido nucleico-polipéptido descritos anteriormente no contienen un ribosoma.

65 **[0032]** En otro aspecto, esta descripción también proporciona una biblioteca que comprende una pluralidad de los complejos de pantalla X descritos anteriormente, en donde al menos una porción de los complejos contiene diferentes

secuencias que codifican polipéptidos.

[0033] En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método de una biblioteca de complejos de ácido nucleico-polipéptido que comprenden las etapas de:

- 5
- proporcionar una biblioteca de secuencias de ARNm que comprende un elemento de secuencia complementaria a un primer enlazador de ácido nucleico
 - proporcionar un primer enlazador de ácido nucleico está operativamente unido a un primer ligando de alta afinidad de manera que el primer enlazador de ácido nucleico se une al ARNm a través de un emparejamiento de bases de ácido nucleico complementario,
 - 10 - proporcionar un segundo ligando de alta afinidad operativamente unido a un receptor peptídico,
 - proporcionar un aceptor de ligando con al menos dos sitios de unión o proporcionar al menos tal que el aceptor de ligando se una al primer ligando de alta afinidad y al segundo ligando de alta afinidad,
 - 15 - permitiendo que se produzca la traducción del ARNm de manera que el aceptor de péptido se una a la proteína traducida formando así un complejo de ácido nucleico-polipéptido que une el ARNm a la proteína.

[0034] En algunas realizaciones, el método comprende además

- 20
- permitir la transcripción inversa del ARNm utilizando el primer enlace de ácido nucleico en el complejo de pantalla X como un cebador de tal manera que se forma un híbrido de ADN/ARN.

[0035] En una realización preferida, el método comprende además

- 25
- la degradación de los ARNm y la síntesis de una cadena de ADN complementaria formando con ello un híbrido de ADN/ADN en el complejo de ácido nucleico-polipéptido.

[0036] En algunas realizaciones, el ARNm en la biblioteca comprende además un potenciador de TMV

[0037] En algunas realizaciones, el ARNm en la biblioteca comprende además una secuencia C_μ.

[0038] En algunas realizaciones, el ARNm en la biblioteca comprende además una etiqueta FLAG.

[0039] En algunas realizaciones, el ARNm en la biblioteca comprende además una secuencia de visualización SA.

[0040] En algunas realizaciones, el ARNm en la biblioteca comprende además una cola A20.

[0041] En otro aspecto, esta descripción también proporciona una biblioteca de complejos de ácido nucleico-polipéptido producidos por los métodos descritos.

[0042] En otro aspecto, esta descripción también proporciona un método para seleccionar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido capaz de unirse a un antígeno de interés, que comprende los pasos de:

- 40
- (a) proporcionar la biblioteca de complejos de visualización X descritos;
 - (b) poner en contacto la biblioteca con un antígeno de interés;
 - 45 (c) seleccionar de la biblioteca al menos un complejo de visualización X que se une al antígeno de interés; y
 - (d) aislar la secuencia codificante del polipéptido del complejo de visualización X seleccionado.

[0043] En otro aspecto, esta descripción también proporciona un método para producir un polipéptido capaz de unirse a un antígeno de interés, que comprende introducir una secuencia codificante de polipéptido identificada por el método descrito en un entorno de expresión de tal manera que se produce el polipéptido codificado.

[0044] En otro aspecto, esta descripción también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido capaz de unirse a un antígeno de interés, seleccionado por el método descrito.

[0045] En otro aspecto, esta descripción también proporciona un complejo de visualización X que comprende:

- 55
- (a) una primera molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido;
 - (b) un polipéptido codificado por la primera molécula de ácido nucleico;
 - 60 (c) una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleica complementaria a una porción de la primera molécula de ácido nucleico;
 - (d) un primer ligando de alta afinidad unido covalentemente a la segunda molécula de ácido nucleico;
 - (e) un primer aceptor de ligando; y
 - (f) un segundo ligando de alta afinidad unido covalentemente a través de una o más moléculas de unión a un aceptor de péptidos,
- 65

en el que la primera molécula de ácido nucleico está unida a la segunda molécula nucleica a través de un emparejamiento de bases de ácido nucleico complementario,
 en el que el primer ligando de alta afinidad es unido no covalentemente al aceptor de ligando en un primer sitio de unión,

5 en el que el segundo ligando está unido no covalentemente al aceptor de ligando en un segundo sitio de unión, y en donde la una o más moléculas de enlace son moléculas de polietilenglicol.

[0046] En algunas realizaciones, el primer ligando de alta afinidad en este complejo es biotina y se selecciona el aceptor de ligando del grupo que comprende estreptavidina, estreptavidina dimérica y estreptavidina tetramérica.

10 [0047] En algunas realizaciones, el segundo ligando de alta afinidad en este complejo es biotina y se selecciona el aceptor de ligando del grupo que comprende estreptavidina, estreptavidina dimérica y estreptavidina tetramérica.

15 [0048] En algunas realizaciones, el primer o segundo ligando de alta afinidad en este complejo se selecciona del grupo que comprende FK506, metotrexato, PPI-2458, biotina, hirudina, ZFVp(O)F, fluoresceína-biotina, ABD (dominio de unión a albúmina), ADN de 18 pb, ARNasa A, cloroalcanos, aril (beta-amino etil) cetonas y proteína A.

20 [0049] En algunas realizaciones, este complejo comprende además un segundo aceptor de ligando. En algunas realizaciones, el segundo aceptor de ligando en el complejo descrito anteriormente se selecciona del grupo que comprende FKBP12, dihidrofolato reductasa, metionina aminopeptidasa, estreptavidina dimérica, tetrámero de estreptavidina, trombina, carboxipeptidasa, Ab monovalente, HSA (albúmina), dedo Zn, hRI (inhibidor de la RNasa), dehalogenasa de haloalcano mutada, haloTag y sortasa.

25 [0051] En algunas realizaciones, el aceptor de péptidos en este complejo es la puromicina.

[0052] En algunas realizaciones, la primera o segunda molécula de ácido nucleico en este complejo comprende además psoraleno.

30 [0053] En algunas realizaciones, el polipéptido se elige del grupo que comprende un anticuerpo, un dominio VH, un dominio VL, un fragmento Fab, un anticuerpo de cadena única, un nanocuerpo, un cuerpo, una adnectina, un aficuerpo, un DARPin, una anticalina, un avímero, un dominio ¹⁰Fn3 y un versacuerpo.

[0054] En otro aspecto, esta descripción proporciona un complejo heterobifuncional que comprende:

- 35 (a) un primer ligando de alta afinidad unido covalentemente a una molécula de ácido nucleico;
 (b) un segundo ligando de alta afinidad unido covalentemente a un aceptor peptídico; y
 (c) un aceptor de ligando que comprende dos o más sitios de unión a ligando;

en donde el primero y el segundo están unidos al aceptor de ligando en distintos sitios de unión de ligando.

40 [0055] En algunas realizaciones, el primer y el segundo ligando de alta afinidad en este complejo son idénticos.

[0056] En algunas realizaciones, el primer y el segundo ligando de alta afinidad en este complejo son biotina.

45 [0057] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico en este complejo comprende un resto psoraleno.

[0058] En algunas realizaciones, el aceptor de péptidos en este complejo es la puromicina.

50 [0059] En algunas realizaciones, el aceptor de ligando en este complejo es una proteína multimérica.

[0060] En algunas realizaciones, el aceptor de ligando en este complejo es estreptavidina.

Breve descripción de los dibujos

55 [0061]

La Figura 1 ilustra una realización de la metodología descrita aquí.

60 *La Figura 2* ilustra lo mismo usando un cebador avanzado que es un cebador de polaridad invertida con dos extremos 3' que pueden cebar convenientemente un ADNc y transportar una puromicina o un derivado o molécula pequeña en el extremo opuesto.

La Figura 3 ilustra lo mismo usando un cebador avanzado que es una variedad de bucle de tallo y puede duplicar y cebar convenientemente un ADNc.

65 *La Figura 4* ilustra una realización de la metodología que se emplea para mejorar o evolucionar la estructura/función de una región variable de cadena pesada de anticuerpo en la que el polipéptido se fusiona con una proteína FK12BP que puede unirse de forma no covalente a la molécula pequeña FK506 unida a

ácido nucleico uniendo así fenotipo mejorado (evolucionado) (polipéptido) con su genotipo codificador (ácido nucleico).

Las Figuras 5 ilustran una realización de la metodología de la visualización *In Vitro* mediante un enlazador oligonucleótido ramificado y un oligonucleótido complementario que comprende un aceptador de péptidos unido covalentemente.

Las Figuras 6 ilustra una realización de la metodología de *in vitro* de visualización mediante un enlazador de oligonucleótidos ramificados, unidos covalentemente a un péptido.

La Figura 7 del aceptador ilustra una realización de la metodología de presentación *in vitro* usando ligandos y aceptores de ligando de alta afinidad.

La Figura 8 ilustra una realización de la metodología de presentación *in vitro* usando ligandos de alta afinidad y aceptores de ligando, en donde el aceptor de ligando está unido covalentemente a un aceptor de péptido.

La Figura 9 ilustra una realización de la metodología de presentación *in vitro* usando ligandos de alta afinidad y aceptores de ligando, en donde el aceptor de ligando está unido no covalentemente a un aceptor de péptido.

La Figura 10 ilustra una realización de la metodología de visualización *in vitro* usando ligandos de alta afinidad y aceptores de ligando, en donde una primera molécula aceptora de ligando está unida covalentemente a un segundo ligando de alta afinidad (no afín), en donde la primera molécula aceptora de ligando puede unirse a un primer ligando afín de alta afinidad unido covalentemente a un ácido nucleico, y en el que el segundo ligando de alta afinidad puede unirse a un segundo receptor de ligando afín fusionado con el polipéptido codificado por el ácido nucleico.

La Figura 11 ilustra un ejemplo no limitante de los componentes individuales usados en una realización de la metodología de presentación *in vitro* usando ligandos de alta afinidad y aceptores de ligandos.

La Figura 12 ilustra un orden de ensamblaje no limitante de complejos nucleicos/proteicos para una realización de la metodología de presentación *in vitro* usando ligandos de alta afinidad y aceptores de ligandos.

La Figura 13 ilustra el diseño de un complejo de visualización X preferido.

La Figura 14 ilustra un esquema ejemplar para preparar una biblioteca VH, ensamblar el complejo de visualización, seleccionar y purificar el complejo de visualización.

La Figura 15 ilustra una muestra de un solo clon para una biblioteca VH. La ilustración muestra la transcripción y la iniciación de la traducción de secuencias, la secuencia de VH, la secuencia de Cu, la secuencia de etiqueta FLAG, un segmento de ADN complementario a un enlazador (*p. ej.*, un enlazador NA).

Figura 16 ilustra las etapas de una realización preferida de la metodología de visualización. La Figura 16A representa primero un complejo de visualización X que comprende una molécula de ARNm (que contiene enlazadores apropiados, etiquetas, regiones complementarias y una cola poli-A) que está unida a un enlazador/cebador RT (un enlazador NA) mediante emparejamiento de cadena complementario y un enlazador de psoraleno. El conector NA se une además covalentemente a una molécula de biotina (B) que está asociada con una molécula de estreptavidina. La estreptavidina se asocia con una segunda molécula de biotina, que se une covalentemente a la puromicina que se ha unido a una proteína traducida. La Figura 16A representa la transcripción inversa (Paso 1) y la degradación de ARN (Paso 2). La Figura 16B representa la síntesis de la segunda cadena para crear un híbrido de ADN/ARN (Paso 4). La final de la representación de 16B es el complejo ADNs de visualización X final (es decir, Complejo de visualización X).

La Figura 17 representa un miembro potencial de la biblioteca y cómo, en algunas realizaciones, los cebadores pueden emplearse con secuenciación 454.

La Figura 18 representa un segmento ejemplar de un miembro de la biblioteca VH.

La Figura 19 representa un segmento ejemplar de un miembro de la biblioteca de pantallas y muestra además secuencias finales de los cebadores (véase la Figura 17).

La Figura 20 representa un segmento ejemplar de un miembro de la biblioteca de visualización y además proporciona la secuencia ejemplar de las regiones TMV UTR y C-mu de los cebadores.

La Figura 21 representa una posible disposición de cebadores para amplificar un clon seleccionado para la secuenciación.

La Figura 22 ilustra el progreso de una realización de la invención desde la biblioteca hasta la selección, ilustrando que el método puede ser iterativo de tal manera que los ácidos nucleicos/proteínas seleccionadas en una ronda se puedan usar para generar una biblioteca para rondas posteriores de formación de complejos de visualización X y selección.

La Figura 23 ilustra una realización de la invención mediante la cual se emplean varias rondas de selección sin regenerar una biblioteca o amplificar los productos de selección.

La Figura 24 ilustra un método de diseño de biblioteca VH y VL a partir de ARNm.

La Figura 25 ilustra una realización ejemplar del método de selección en el que la molécula diana utilizada en la selección por afinidad se inmoviliza sobre un soporte sólido.

La Figura 26 ilustra una realización ejemplar del método de selección en el que la molécula diana utilizada en la selección por afinidad se expresa en una superficie celular. En tal realización, el complejo de visualización se selecciona contra las células no expresan el complejo (*p. ej.*, a fin de eliminar los complejos que se unen las células, pero no se unen a la diana de interés) y luego seleccionados contra las células que expresan la diana de interés (es decir, para identificar ligantes específicos).

La Figura 27 ilustra un complejo de ADN de visualización X (es decir, una proteína de fusión de ADN) en la que las etiquetas de código han sido incorporadas en el ácido nucleico (*p. ej.*, para identificar la fuente de la codificación de ADN) y una codificación de fuente constante utilizada para etiquetar ácidos nucleicos de

diferentes rondas de selecciones (útil, por ejemplo, al agrupar ácido nucleico de diferentes rondas de selección para una ejecución de secuenciación).

La Figura 28 ilustra un complejo de ADN de visualización X (es decir, una fusión de ADN-proteína) y la adición de un cebador N6.

La Figura 29 representa un diagrama de flujo que muestra una realización de un esquema de análisis de secuencia.

La Figura 30 ilustra un resultado ejemplar del proceso de transcripción, purificación y reticulación de ARNm.

La Figura 31 ilustra un resultado ejemplar del proceso de transcripción, purificación y carga de estreptavidina de ARNm.

La Figura 32 ilustra un resultado ejemplar después del tratamiento con RNasaH y el proceso de elución.

La Figura 33 ilustra un resultado ejemplar después del tratamiento con RNasaH y el proceso de elución.

La Figura 34 ilustra un resultado ejemplar después de RT-PCR y el proceso de síntesis de 2ª hebra.

La Figura 35 ilustra el etiquetado de agrupación que se puede usar en el diseño de la biblioteca para permitir la agrupación de rondas de selección múltiple en una ejecución de secuenciación.

La Figura 36 ilustra células donantes ejemplares para la preparación de una biblioteca de VH.

Descripción detallada de la invención

[0062] La presente descripción proporciona composiciones y métodos para seleccionar y evolucionar propiedades deseadas de proteínas y ácidos nucleicos. El método puede denominarse en el presente documento "Visualización X" o, en algunas realizaciones donde se emplea estreptavidina, "Visualización SA". En diversas realizaciones, la presente invención incluye pequeñas moléculas unidas a ácido nucleico o ácido nucleico modificado. Otras realizaciones de la divulgación incluyen métodos para producir polipéptidos, incluidos péptidos con aminoácidos modificados, ensayos para permitir la selección de miembros individuales de la población que tienen propiedades deseadas, y métodos para generar nuevas variaciones de polipéptidos con propiedades mejoradas.

[0063] Por "seleccionar" se entiende dividir sustancialmente una molécula de otras moléculas en una población. Como se usa en el presente documento, una etapa de "selección" proporciona al menos 2 veces, en algunas realizaciones 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, preferiblemente 30 veces, más preferiblemente, 100 veces, y, lo más preferiblemente, un enriquecimiento de 1000 veces de una molécula deseada en relación con moléculas no deseadas en una población después de la etapa de selección. Un paso de selección puede repetirse cualquier número de veces, y diferentes tipos de pasos de selección pueden combinarse en un enfoque dado.

[0064] Por "proteína" se entiende dos o más aminoácidos naturales o modificados unidos por uno o más enlaces peptídicos. "Proteína" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento.

[0065] Por "ARN" se entiende una secuencia de dos o más ribonucleótidos unidos de forma covalente, naturales o modificados. Un ejemplo de un ARN modificado incluido en este término es el ARN de fosforioato.

[0066] Por "ADN" se entiende una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos modificados de forma natural o unidos covalentemente.

[0067] Por "ácido nucleico" se entiende dos o más nucleótidos o análogos o derivados de nucleótidos unidos covalentemente. Como se usa en este documento, este término incluye, sin limitación, ADN, ARN y ANP. El término "ácido nucleico" puede incluir un ácido nucleico modificado y, en consecuencia, el ácido nucleico y el ácido nucleico modificado pueden usarse indistintamente.

[0068] El término "análogo de nucleótido" o "derivado de nucleótidos" o "ácido nucleico modificado" tal como se utiliza aquí se refiere a nucleótidos modificados o no naturales tales como pirimidinas 5-propinilo (es decir, 5-propinil-dTTP y 5-propinil-dTCP), purinas 7-deaza (es decir, 7-deaza-dATP y 7-deaza-dGTP). Los análogos de nucleótidos incluyen análogos de bases y comprenden formas modificadas de desoxirribonucleótidos, así como ribonucleótidos.

[0069] Por "péptido aceptor" se entiende cualquier molécula capaz de ser añadida al extremo C de una proteína creciente de la cadena por la actividad catalítica de la función peptidil transferasa ribosómica. Típicamente, tales moléculas contienen (i) un nucleótido o un resto similar a un nucleótido (por ejemplo, adenosina o un análogo de adenosina (la metilación en la posición amino N-6 es aceptable)), (ii) un aminoácido o resto similar a aminoácido (por ejemplo, cualquiera de los 20 aminoácidos D o L o cualquier análogo de aminoácidos de los mismos (por ejemplo, O-metil tirosina o cualquiera de los análogos descritos por Ellman et al., Meth. Enzymol. 202: 301, 1991), y (iii) un enlace entre los dos (por ejemplo, un enlace éster, amida o cetona en la posición 3' o, menos preferiblemente, la posición 2'); preferiblemente, este enlace no perturba significativamente el fruncido del anillo de la conformación de ribonucleótidos natural. Los aceptores de péptidos también pueden poseer un nucleófilo, que puede ser, sin limitación, un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo sulfhidrilo. Además, los aceptores de péptidos pueden estar compuestos de nucleótidos miméticos, miméticos de aminoácidos, o miméticos de la estructura del nucleótido-aminoácido combinada.

[0070] Tal como se usa en este documento, los términos "complejo de visualización X", "complejo de ácido nucleico-

polipéptido" y "fusiones de ácido nucleico-proteína" son intercambiables y están destinados a referirse a un complejo formado a partir de la interacción, directa o indirectamente, de un nucleico ácido y una proteína (o péptido o fragmento del mismo) codificada por el ácido nucleico. En algunos casos, los complejos de visualización X pueden denominarse "complejos de visualización" o "fusiones de visualización" y el experto en la técnica entenderá por el contexto de tal uso que no debe confundirse con otros tipos de sistemas de visualización a los que se puede hacer referencia en el presente documento. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN, *p. ej.*, ARNm. En otras realizaciones preferidas, el ácido nucleico es ADN o ADNc. En consecuencia, en algunas realizaciones en las que el objetivo es mostrar un complejo que contiene ADN, el complejo de visualización X puede denominarse "fusión de ADN-proteína" o "fusión de visualización de ADN". Es importante tener en cuenta que el uso del término "fusión" no implica ni sugiere que el ácido nucleico esté unido covalentemente al péptido o proteína. En algunas realizaciones, el ARN o el ADN pueden modificarse o alterarse. La interacción entre el ácido nucleico y la proteína no es covalente (*p. ej.*, la interacción puede estar mediada por interacciones biotina/estreptavidina, moléculas enlazadoras y similares como se describe aquí). En realizaciones preferidas, el ácido nucleico es ARNm o ARNm modificado.

[0071] Por una "función alterada" se entiende cualquier cambio cualitativo o cuantitativo en la función de una molécula.

[0072] Por "pareja de unión", como se usa aquí, se entiende cualquier molécula que tiene una afinidad específica, covalente o no covalente por una porción de una proteína de fusión de ADN deseada. Los ejemplos de parejas de unión incluyen, sin limitación, miembros de pares de antígeno/anticuerpo, pares de proteína/inhibidor, pares de receptor/ligando (por ejemplo, pares de receptor de superficie celular/ligando, tales como pares de receptor de hormonas/hormona de péptidos), pares de enzima/sustrato (por ejemplo, pares de quinasa/sustrato), pares de lectina/carbohidrato, agregados de proteínas oligoméricas o heterooligoméricas, pares de proteínas de unión a ADN/sitios de unión a ADN, pares de ARN/proteínas y dúplex de ácidos nucleicos, heterodúplex o cadenas ligadas, así como cualquier molécula que es capaz de formar uno o más enlaces covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces disulfuro) con cualquier parte de un complejo de visualización X.

[0073] Por "soporte sólido" se entiende, sin limitación, cualquier columna (o material de columna), perla, tubo de ensayo, de microtitulación de plato, partícula sólida (por ejemplo, agarosa o sefarosa), microchip (por ejemplo, silicio, vidrio de silicio o chip de oro), o membrana (por ejemplo, la membrana de un liposoma o vesícula) a la que se puede unir un complejo de afinidad, ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de otros intermediarios asociados de unión tales como otros anticuerpos o proteínas A), o en el que puede integrarse un complejo de afinidad (por ejemplo, a través de un receptor o canal).

Ácido nucleico o enlazadores de ácidos nucleicos modificados para mediar en el complejo de visualización X

[0074] En un aspecto de la invención un ácido nucleico (*p. ej.*, un ARNm nativo o ARNm modificado) puede estar unido a su proteína codificada al final de traducción mediante el uso de un enlazador de ácido nucleico o ácido nucleico modificado ("enlazador NA") que se hibrida en el extremo 3' del ácido nucleico. En dicha realización, el enlazador de NA tiene polaridad invertida en el enlazador de modo que efectivamente tiene dos extremos 3', de los cuales el extremo no hibridado le ha unido una puromicina o un análogo relacionado o una molécula pequeña capaz de unirse covalentemente o no covalentemente con alta afinidad por la proteína del polipéptido. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el complejo de visualización X se forma por la interacción de la proteína y el ácido nucleico con el conector NA.

[0075] En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador NA psoraleno. En algunas realizaciones preferidas, el enlazador es XB-PBI. En algunas realizaciones, se puede usar XB-DDB. En algunas realizaciones preferidas, el enlazador (*p. ej.*, un enlazador PBI o enlazador DDB) se une a un ligando de alta afinidad (*p. ej.*, biotina), es decir, el conector incluye el ligando de alta afinidad.

[0076] En algunas realizaciones, un ácido nucleico (*p. ej.*, un ARNm nativo o ARNm modificado) puede ser reticulado a un enlazador NA que está unido además a un aceptor de péptido o un ligando de alta afinidad. Dicha reticulación puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6,416,950 describe métodos que hacen tales entrecruzamientos (véase, *p. ej.*, las Figuras 9-13 de la patente US. N° 6,416,950).

[0077] En una realización adicional, la invención incluye una función de enlazador NA dual con polaridad invertida 5'-3' en el enlazador, tal que es capaz de hibridar con el ácido nucleico, por ejemplo, una plantilla de ARNm o ARNm modificado, en donde la hibridación ocurre en un extremo 3' del ARNm fuera de la región de codificación, y en donde el ácido nucleico/conector modificado lleva en su otro extremo 3' un aceptor de péptido tal como puromicina o análogos funcionales del mismo (por ejemplo, pero no limitado a, pirazolopirimidina) o una molécula pequeña capaz de unirse covalentemente o con alta afinidad a la proteína del polipéptido.

[0078] En varias realizaciones, un ácido nucleico, preferiblemente un ARNm o ARNm modificado, se hibrida con el ligador de NA en el extremo 3', que es en sí misma unido covalentemente o con alta afinidad al polipéptido (o polipéptido modificado) a través de un enlace covalente o por un enlace no covalente de alta afinidad.

[0079] En realizaciones adicionales, el enlazador NA es capaz de servir como cebador para transcripción inversa del

ARNm.

[0080] Una realización adicional comprende un ácido nucleico codificador operativamente unido a un enlazador NA que lleva una parte de ácido nucleico de polaridad inversa en su "extremo 5'" (entre comillas, ya que efectivamente tiene una polaridad 3' para dirigir la polimerización), tales que puede servir como cebador para la polimerización en la plantilla de ácido nucleico codificante, además de su capacidad para unirse, a través de una estructura de bucle de tallo, a un conector NA que porta una puomicina o una molécula análoga o pequeña relacionada en su extremo 3' (ver Figuras 2 y 3).

[0081] En algunas realizaciones, el ácido nucleico codificador está unido operativamente a un enlazador NA ramificado, donde una porción del forro de NA es complementaria al extremo 3' del ácido nucleico que codifica (ver la Figura 5). Se contempla cualquier medio reconocido en la técnica para generar un conector NA ramificado. El punto de ramificación puede ocurrir en cualquier ubicación dentro del enlazador de NA. Dichos enlazadores de NA ramificados también pueden servir como cebadores para la transcripción inversa del ácido nucleico codificador, *p. ej.*, un ARNm, al que están vinculados.

[0082] En algunas realizaciones, el ácido nucleico de codificación está unido operativamente a un enlazador NA ramificado, en el que el enlazador se une covalentemente a un aceptor peptídico (ver figura 6).

[0083] En algunas realizaciones, el enlazador NA comprende ácidos nucleicos bloqueados (LNA) *p. ej.*, ácidos nucleicos bicíclicos donde un ribonucleósido está unido entre el 2'-oxígeno y los átomos de 4'-carbono con una unidad de metileno. En una realización particular, la región del conector NA que es complementaria al ácido nucleico codificante comprende LNA, al menos en parte, para aumentar la estabilidad dúplex de ácido nucleico (véase Kaur et al. (2006). *Biochemistry* 45 (23): 7347-55).

Enlazador de ligando/aceptor.

[0084] En otro aspecto, el complejo de visualización X (*p. ej.*, el ácido nucleico de codificación y el polipéptido codificado) está formado a través de la alta afinidad o unión covalente de un ligando de afinidad alta a su par de unión a cognado (aceptor de ligando). En tales realizaciones, un ácido nucleico puede estar ligado covalentemente o no covalentemente a un ligando de alta afinidad, que a su vez se une a un aceptor de ligando de forma no covalente o covalente. En realizaciones preferidas, la interacción es no covalente. En algunas realizaciones, el ligando de aceptor está asociado además con un segundo ligando de alta afinidad, que a su vez está unido a un aceptor de péptido.

[0085] Los ejemplos no limitantes de ligando de alta afinidad/pares de aceptor de ligando incluyen, pero no se limitan a, FK506/FK BP12, metotrexato/dihidrofolato reductasa y PPI-2458/metionina aminopeptidasa 2. En la Tabla 1 se muestran ejemplos no limitantes adicionales de pares de ligando/aceptores de ligando. En algunas realizaciones, el par de ligando/aceptores de ligando es biotina/estreptavidina. Se considera que cualquier forma de estreptavidina se usa en los métodos de la invención, incluyendo, pero sin limitación, estreptavidina monomérica, estreptavidina dimérica, estreptavidina tetramérica y variantes modificadas química o genéticamente de la misma. En algunas realizaciones, el aceptor de ligando es estreptavidina tetramérica. En una realización particular, la estreptavidina tetramérica se reticula químicamente para aumentar la estabilidad.

Tabla 1. Ejemplos no limitantes de pares ligando/receptor de ligando de alta afinidad

| Ligando de alta afinidad | Tamaño del ligando | Aceptor de ligando | Tamaño del aceptor | K _d o K _i | Referencia |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|--|
| Biotina | Molécula pequeña | Tetramero de estreptavidina | 53 kDa | 1-20 fM | |
| Hirudin | Péptido 65 aa | Trombina | 36 kDa | 20 fM | |
| ZFV ^p (O)F | tripéptido | carboxipeptidasa | | 10-27 fM | Biochemistry 1991, 30: 8165-70 |
| Fluoresceína biotina | | Ab monovalente | | 48 fM | PNAS 2000, 97: 10701-5 |
| ABD (dominio de unión a albúmina) | 46 aa | HSA (albúmina) | | 50-500 fM | Prot. Ing. Des. Select. 2008, 21: 515-27 |
| ADN de 18 pb | | Dedo Zn | 6 dominios de dedo Zn | 2 fM | PNAS 1998, 95: 2812-17 |

(continuación)

| Ligando de alta afinidad | Tamaño del ligando | Aceptor de ligando | Tamaño del aceptor | Kd o Ki | Referencia |
|---|-----------------------|--|--------------------|--------------|---|
| ARNasa A | 13 kDa | hRI (inhibidor de RNasa) | 50 kDa | 290 aM-1 fM | JMB 2007, 368: 434-449 |
| Cloroalcanos | | Dehalogenasa de haloalcano mutada, HaloTag | Promega | irreversible | ACS Chem.Bio 2008, 3: 373-82 |
| Inhibidores de aril (beta-amino etil) cetonas | Moléculas pequeñas | Sortasa | | irreversible | JBC 2007, 282: 23129 Identificación del gen sortase USP7101692 |
| Proteína A | Anticuerpo dominio Fc | | | 1 fM | |

[0086] En algunas realizaciones, el ligando de alta afinidad está unido covalentemente al ácido nucleico (ligando/molécula de ácido nucleico). Se contempla cualquier método reconocido en la técnica para unir el ligando de alta afinidad al ácido nucleico. En una realización, el ligando de alta afinidad está unido covalentemente al extremo 3' de una molécula de ARNm.

[0087] En algunas realizaciones, la molécula de aceptor de ligando de alta afinidad está unida covalentemente a un aceptor de péptidos, que a su vez, puede unirse covalentemente a una proteína traducida por la actividad peptidil transferasa de un ribosoma (ver figura 8). El enlace del aceptor de ligando de alta afinidad con el aceptor de péptido puede ser directo o mediante una molécula enlazadora. Cualquier molécula de enlace reconocida en la técnica se contempla para su uso en los métodos de la invención. En una realización, el aceptor de ligando de alta afinidad está unido al aceptor de péptidos usando una molécula enlazadora de polietilenglicol.

[0088] En algunas realizaciones, el ligando de alta afinidad está unido covalentemente a un aceptor de péptidos, que a su vez, puede unirse covalentemente a una proteína traducida por la actividad peptidil transferasa de un ribosoma (ver figura 9). En algunas realizaciones preferidas, tales moléculasceptoras de ligando/péptido se pueden unir de forma no covalente a una molécula de ligando/ácido nucleico a través de un aceptor de ligando multimérico, *p. ej.*, estreptavidina tetramérica. El enlace covalente del ligando de alta afinidad con el aceptor peptídico puede ser directo o mediante una molécula enlazadora. Cualquier enlazador reconocido en la técnica se contempla para su uso en los métodos de la invención. En una realización particular, el ligando de alta afinidad se une al aceptor de péptidos usando una molécula enlazadora de polietilenglicol.

[0089] En algunas realizaciones, la molécula aceptor de ligando se fusiona con el polipéptido codificado por el ácido nucleico (ver las figuras 4 y 10). Dicha fusión puede realizarse químicamente, usando reticuladores química o genéticamente. La molécula aceptor de ligando puede fusionarse con el polipéptido codificado en cualquier región. En una realización particular, la molécula aceptor de ligando está genéticamente fusionada a la región N terminal del polipéptido codificado.

[0090] En algunas realizaciones, una primera molécula de aceptor de ligando está unida covalentemente a un segundo ligando de alta afinidad (no afin). En tales realizaciones, la primera molécula aceptor de ligando puede unirse a un primer ligando afín de alta afinidad que está unido covalentemente a un ácido nucleico. El segundo ligando de alta afinidad puede unirse a un segundo receptor ligando asociado que está fusionado con el polipéptido codificado por el ácido nucleico.

[0091] En una realización preferida, una molécula de aceptor de ligando, preferiblemente un aceptor de ligando multivalente (*p. ej.*, estreptavidina multivalente), se une de forma no covalente a un primer ligando de alta afinidad (*p. ej.*, biotina), que está unido covalentemente a un ácido nucleico que es complementario a una molécula de ARNm. El aceptor de ligando multivalente también se une no covalentemente a un segundo ligando de alta afinidad (*p. ej.*, biotina), que está unido de manera covalente al aceptor de péptido (*p. ej.*, puromicina). El segundo ligando de alta afinidad puede estar conectado al aceptor de péptidos directamente o mediante un enlazador (como se describe más adelante, *p. ej.*, polietilenglicol). En realizaciones preferidas, el ácido nucleico unido al primer ligando de alta afinidad es complementario al extremo 3' del ARNm. El ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico en un conector NA) debe ser al menos lo suficientemente largo como para unirse de manera estable al ácido nucleico que codifica la proteína (por ejemplo, ARNm) del complejo de visualización X. En algunas realizaciones, el ácido nucleico unido al primer ligando de alta afinidad tiene entre 15 y 100 nucleótidos de longitud, entre 15 y 80 nucleótidos de longitud, entre 15 y 50 nucleótidos de longitud, entre 5 y 40 nucleótidos de longitud, entre 15 y 30 nucleótidos de longitud, entre 15 y 20 nucleótidos de longitud, entre 10 y 20 nucleótidos de longitud, o entre 15 y 18 nucleótidos de longitud. En algunas

realizaciones, el ácido nucleico unido al primer ligando de alta afinidad tiene 15 nucleótidos de longitud, 18, nucleótidos de longitud, 20 nucleótidos de longitud, 30 nucleótidos de longitud, 50 nucleótidos de longitud, 70 nucleótidos de longitud, 80 nucleótidos de longitud, o 87 nucleótidos de longitud.

5 **[0092]** Varias realizaciones de la presente invención incluyen un método para unir establemente un ARNm o un ARNm modificado, un conector NA unido operativamente a una puromicina o análogo o una molécula pequeña, y un polipéptido codificado por el ARNm juntos para formar un complejo de polipeptídico unido a ARNm.

10 **[0093]** En una realización preferida, el enlazador NA se utiliza como un cebador para polimerizar una segunda cadena de ácido nucleico en el complejo de polipéptido de ARNm para formar un dúplex de ácido nucleico unido al polipéptido. En una realización preferida, la polimerización es la transcripción inversa para formar un híbrido de ADN (o ADN modificado).

15 **[0094]** Varias realizaciones de la presente descripción incluyen métodos para comprender una pluralidad de complejos distintos de visualización X, proporcionar un ligando con una característica de unión deseada, poner en contacto los complejos con el ligando, eliminar complejos no unidos y recuperar complejos unidos al ligando.

20 **[0095]** Varios métodos de la descripción actual implican la evolución de moléculas de ácido nucleico y/o proteínas. En una realización, esta descripción comprende amplificar el componente de ácido nucleico de los complejos recuperados e introducir variación en la secuencia de los ácidos nucleicos. En otras realizaciones, el método comprende además traducir polipéptidos de los ácidos nucleicos amplificados y variados, unirlos usando el ácido nucleico/conectores modificados y ponerlos en contacto con el ligando para seleccionar otra nueva población de complejos unidos. Varias realizaciones de la presente divulgación usan complejos de proteína-ARNm seleccionados en un proceso de evolución *in vitro*, especialmente el proceso iterativo en el que el ARNm seleccionado se reproduce con variación, se traduce y se conecta nuevamente a la proteína relacionada para la selección.

Restos enlazadores

30 **[0096]** En algunas realizaciones, la presente invención emplea uno o más restos enlazadores (separados del enlazador NA descrito anteriormente). En algunas realizaciones, se pueden emplear restos enlazadores para conectar un ácido nucleico a un aceptor peptídico. En otras realizaciones restos enlazadores se pueden utilizar para conectar un ligando de alta afinidad (*p. ej.*, biotina) o un aceptor de ligando (*p. ej.*, estreptavidina) a un aceptor de péptidos. En otra realización, se pueden usar restos enlazadores para conectar un ácido nucleico a un ligando de alta afinidad. Como se usa en el presente documento, el término "restos enlazadores" puede incluir uno o más restos o subunidades enlazadoras.

40 **[0097]** En algunas realizaciones preferidas, los restos enlazadores son óxido de polialquileno, que son restos de un género de compuestos que tienen una cadena principal de poliéter. Las especies de óxido de polialquileno de uso en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, especies de cadena lineal y ramificada. Por ejemplo, el poli(etilenglicol) es un óxido de polialquileno que consiste en subunidades repetidas de óxido de etileno, que pueden incluir o no restos reactivos, activables o inertes adicionales en cualquier extremo. Los derivados de especies de óxido de polialquileno de cadena lineal que son heterobifuncionales también se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, el resto enlazador puede estar compuesto de 5 a 50 subunidades de óxido de polialquileno, 10 a 30 subunidades de óxido de polialquileno, 10 a 20 unidades de óxido de polialquileno, 15 a 20 unidades de óxido de polialquileno, o, en algunas realizaciones, 18 subunidades de óxido de polialquileno. Un experto en la materia apreciará que puede usarse cualquier cantidad de restos enlazadores siempre que sea posible que se forme el complejo de visualización X.

50 **[0098]** Un poli(etilenglicol) enlazador es un resto que tiene un poli(etilenglicol) ("PEG") columna vertebral o metoxi-PEG ("mPEG") columna vertebral, incluyendo derivados de PEG y MPEG. Se conoce una amplia variedad de derivados de PEG y mPEG en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, Nektar, Inc. Huntsville, Ala., Proporciona compuestos de PEG y mPEG útiles como enlazadores o grupos modificadores que opcionalmente tienen grupos reactivos nucleofílicos, grupos reactivos de carboxilo, grupos activados electrofílicamente (por ejemplo, ésteres activos, carbonatos de nitrofenilo, isocianatos, etc.), grupos sulfhidrilo selectivos (por ejemplo, maleimida), y (que tienen dos grupos reactivos en ambos extremos de la PEG o mPEG) heterofuncionales, los grupos de biotina, de vinilo grupos reactivos, grupos silano, grupos de fosfolípidos, y similares.

60 **[0099]** En otras realizaciones, los restos enlazadores pueden ser ácidos nucleicos o cualquier otro enlazador reconocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear ácidos polisálicos (PSA) y derivados de PSA (véanse la patente de los Estados Unidos N° 5,846,951, la publicación de la patente de los Estados Unidos N° US20080262209 y la solicitud PCT WO2005/016973 y WO-A-01879221).

65 **[0100]** Aunque el aceptor peptídico preferido es puromicina, se pueden usar otros compuestos que actúan de manera similar a la puromicina. Otras opciones posibles para los aceptores de proteínas incluyen pirazolopirimidina o cualquier derivado relacionado y estructuras similares a ARNt, y otros compuestos conocidos en la técnica. Dichos compuestos incluyen, sin limitación, cualquier compuesto que posea un aminoácido unido a una adenina o un compuesto similar a

la adenina, como los nucleótidos de aminoácidos, fenilalanil-adenosina (A-Phe), tirosil adenosina (A-Tyr) y alanil adenosina (A-Ala), así como estructuras unidas a amida, tales como fenilalanil 3' desoxi 3' amino adenosina, alanil 3' desoxi 3' amino adenosina y tirosil 3' desoxi 3' amino adenosina; En cualquiera de estos compuestos, se puede utilizar cualquiera de los L-aminoácidos naturales o sus análogos. Además, también se puede usar en la invención un conjugado combinado de 3' estructura-puromicina de tipo ARNt.

Sistemas de traducción

[0101] Varias realizaciones de la divulgación utilizan métodos preferidos en los que el ARNm se traduce en un sistema de traducción *in vitro* que carece de factores de liberación. De este modo, el ribosoma se detiene en el codón de parada, lo que da tiempo para que la puromicina o el análogo o una molécula pequeña se unan covalentemente o con alta afinidad a la proteína del polipéptido.

[0102] En algunas realizaciones de la divulgación, el ARNm se traduce en un sistema de traducción *in vitro* en el que la función de al menos uno de los factores de liberación se inhibe por inhibidores del factor de liberación. Los inhibidores adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos del factor anti-liberación.

[0103] A medida que el método se lleva a cabo preferiblemente utilizando sistemas de traducción *in vitro*, se sabe en la técnica que se pueden incorporar aminoácidos modificados en la maquinaria de traducción para crear polipéptidos con modificaciones químicas.

[0104] Una variedad de sistemas de traducción *in vitro* se puede usar como un sistema de lisado de reticulocitos, extracto de germen de trigo del sistema, u otro sistema de transcripción *in vitro* adecuado. En una realización preferida, se emplea el sistema PURES (cosmobio.co.jp/export_e/products/proteins/products_PGM_20060907_06.asp). El sistema de traducción de flujo continuo libre de células (CFCF) de Spirin et al. (1988) Science 242: 1162 puede usarse para aumentar el rendimiento total de los miembros de la biblioteca, o por conveniencia de uso, si se desea. Se puede usar un sistema estático de síntesis de proteínas *in vitro*. En este sistema, la síntesis de proteínas generalmente cesa después de 1 h y, por lo tanto, limita el intervalo de tiempo para la creación de la biblioteca. La ventaja de la tecnología CFCF es que la síntesis de proteínas de alto nivel y a largo plazo debería dar como resultado una biblioteca mucho más amplia y diversa de complejos de proteína-ARN. La tecnología CFCF ha sido descrita por Spirin y sus colaboradores como un método para la síntesis de proteínas de alto nivel durante un período prolongado de 24 horas o más. Además, la tecnología CFCF da como resultado el fraccionamiento de la proteína recién sintetizada del aparato de traducción y, por lo tanto, hace posible secuestrar rápidamente los complejos de proteína-ácido nucleico. Otras aplicaciones de la tecnología CFCF incluyen un método eficiente para sintetizar péptidos. Por ejemplo, después de la identificación de una fusión peptídica que se une a una diana con alta afinidad, el péptido libre puede sintetizarse directamente usando la tecnología CFCF y usarse en un ensayo de unión.

[0105] También se pueden usar otras técnicas libres de células para unir un polinucleótido a un polipéptido (es decir, un fenotipo), *p. ej.*, Profusion™ (ver, *p. ej.*, Patentes de los Estados Unidos Núms. 6,348,315; 6,261,804; 6,258,558 y 6,214,553).

[0106] Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales *p. ej.* fago, o fagémido, según sea apropiado para una expresión particular o sistema de traducción *in vitro*. Para más detalles, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, 2ª edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

[0107] En algunas realizaciones no se emplean vectores de expresión tales como plásmidos o vectores virales, *p. ej.*, cuando el ADN a expresar existe solo en una cadena de ADN amplificada por PCR.

[0108] En realizaciones adicionales, los métodos de la invención pueden emplear métodos y/o composiciones descritas en la patente de EE.UU. N^{os} 7,078,197, 6,429,300, 5,922,545, 7,195,880, 6,416,950, 6,602,685, 6,623,926, 6,951,725, o en la sol. de patente de EE.UU. N^{os} 11/543,316, 10/208,357.

[0109] En una forma de realización preferida de ARNm, que contiene un codón de parada intacto y la región de 3' no traducida del ARN suficiente para la unión de un cebador de oligonucleótido, se traduce en un sistema de traducción *in vitro* que carece de factores de liberación (*p. ej.*, PURE-System, cosmobio.co.jp/export_e/products/protein/products_PGM_20060907_06.asp). Los factores de liberación desencadenan la hidrólisis del enlace éster en peptidil-ARNt y la liberación de la proteína recién sintetizada del ribosoma. En ausencia de los factores de liberación, el ribosoma se detendrá en el ARNm. A continuación, se agrega un oligonucleótido de ADN a la mezcla. Este oligonucleótido es complementario al extremo 3' del ARNm y se funcionaliza con un conector que es capaz de administrar una especie aceptora de péptidos en el ribosoma para

formar un aducto covalente con la proteína traducida unida. En algunas realizaciones, se agrega un enlazador NA. El sitio de unión del enlazador puede estar en cualquier lugar a lo largo del oligonucleótido con la excepción del extremo 3'. El conector debe tener la longitud suficiente para alcanzar el ribosoma. La especie que forma el aducto es preferiblemente puromicina o pirazolopirimidina o cualquier derivado relacionado.

[0110] Después de la adición covalente del conector a la proteína naciente, se agrega EDTA para liberar los ribosomas, la especie de ARNm-oligonucleótido-proteína se aísla posteriormente y se somete a transcripción inversa para crear la fusión de ADN-proteína. Finalmente, la segunda cadena de ADN se agrega usando cualquier ADN polimerasa. En tal realización, aunque la especie de oligonucleótido de ARNm (*p. ej.*, conector NA) puede estar unida covalentemente, no se requiere que el conector NA esté unido covalentemente a ninguna especie intermedia en el complejo de visualización X (*p. ej.*, si se usa biotina/estreptavidina para unir el ARNm a la proteína).

[0111] La fusión resultante de ADN-proteína se puede usar para la detección in vivo o in vitro o para aplicaciones de diagnóstico.

Usos

[0112] Los métodos y composiciones de la presente invención tienen aplicaciones comerciales en cualquier área donde la tecnología de proteínas se usa para resolver problemas terapéuticos, diagnósticos o industriales. Esta tecnología de visualización X es útil para mejorar o alterar las proteínas existentes, así como para aislar nuevas proteínas con las funciones deseadas. Estas proteínas pueden ser secuencias de origen natural, pueden ser formas alteradas de secuencias de origen natural o pueden ser secuencias parcial o totalmente sintéticas.

[0113] Los métodos de la invención se pueden usar para desarrollar o mejorar polipéptidos tales como inmunoaglutinantes, por ejemplo, los anticuerpos, fragmentos o análogos de los mismos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos catalíticos, VL y/o VH de unión a regiones, fragmentos Fab, fragmentos Fv, Fragmentos Fab', Dabs, y similares. En algunas realizaciones, los polipéptidos a mejorar pueden ser cualquier polipéptido que tenga una inmunoglobulina o dominio similar a la inmunoglobulina, por ejemplo Interferones, Proteína A, Anquirinas, dominios A, receptores de células T, fibronectina III, gamma-cristalina, dominios de unión a antígeno de moléculas de clase MHC (*p. ej.*, los dominios de unión a antígeno alfa y beta de CD8), Ubiquitina, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas y muchos otros, como se revisó en Binz, A. et al. (2005) Nature Biotechnology 23: 1257 y Barclay (2003) Semin Immunol. 15 (4): 215-223. En algunas realizaciones, como las bibliotecas de inmunoglobulinas derivadas del repertorio de inmunidad humana, una biblioteca única utiliza muchas secuencias diferentes de la región V como andamios, pero todas comparten el pliegue básico de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina o pliegue similar a la inmunoglobulina es una estructura de la proteína en forma de barril que comprende dos hojas β que comprende varios (*p. ej.*, siete en el caso de una cadena ligera C-dominio de una IgG.) Cadenas β anti-paralelas unidas por un enlace disulfuro. Por consiguiente, se contempla la mejora o selección de cualquier inmunoglobulina o proteína de tipo inmunoglobulina, incluidas porciones o fragmentos de las mismas.

[0114] En otra aplicación, la tecnología de visualización X descrita en este documento es útil para el aislamiento de proteínas con unión específica (por ejemplo, unión a ligando) propiedades que pueden o no tener y inmunoglobulina o dominio similar a inmunoglobulina. Las proteínas que exhiben interacciones de unión altamente específicas pueden usarse como reactivos de reconocimiento sin anticuerpos, lo que permite que la tecnología de visualización X evite la tecnología de anticuerpos monoclonales tradicionales. Los reactivos de tipo anticuerpo aislados por este método pueden usarse en cualquier área donde se utilizan anticuerpos tradicionales, incluidas las aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

[0115] En realizaciones preferidas, los métodos se centrarán en la mejora de los inmunobinders, por ejemplo, regiones de la región variable y/o CDR de una molécula de anticuerpo, es decir, la estructura responsable de la actividad de unión al antígeno que se compone de regiones variables de dos cadenas, una de la cadena pesada (VH) y otra de la cadena ligera (VL). Una vez que se identifican las características de unión al antígeno deseadas, la(s) región(es) variable(s) se pueden diseñar en una clase de anticuerpo apropiada tal como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE. Se entiende que los métodos pueden emplearse para mejorar y/o seleccionar inmunobinders humanos y/o inmunoaglutinantes de otras especies, *p. ej.*, cualesquiera inmunoaglutinantes mamíferos o de no mamíferos, anticuerpos de camélidos, anticuerpos de tiburón, etc.

[0116] La presente invención puede ser utilizada para mejorar anticuerpos humanos o humanizados (o fragmentos de los mismos) para el tratamiento de cualquiera de un número de enfermedades. En esta aplicación, se desarrollan bibliotecas de anticuerpos y se examinan in vitro, eliminando la necesidad de técnicas como la fusión celular o la presentación en fagos. En una aplicación importante, la invención es útil para mejorar las bibliotecas de anticuerpos de cadena sencilla (Ward y col., Nature 341: 544 (1989); y Goulot y col., J. Mol. Biol. 213: 617 (1990)). Para esta aplicación, la región variable puede ser construida ya sea de una fuente humana (para minimizar posibles reacciones inmunes adversas del receptor) o puede contener un casete totalmente aleatorizado (para maximizar la complejidad de la biblioteca). Para detectar moléculas de anticuerpos mejoradas, se analiza la unión de una molécula candidata a una molécula diana. Los niveles más altos de rigurosidad se aplican al paso de encuadración a medida que la selección avanza de una ronda a la siguiente. Para aumentar la rigurosidad, se pueden alterar condiciones tales como

el número de etapas de lavado, la concentración del competidor en exceso, las condiciones del tampón, la duración del tiempo de reacción de unión y la elección de la matriz de inmovilización. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden usarse directamente para terapia o indirectamente para el diseño de anticuerpos estándar. Tales anticuerpos tienen una serie de aplicaciones potenciales, que incluyen el aislamiento de anticuerpos anti-autoinmunes, la supresión inmune y el desarrollo de vacunas para enfermedades virales como el SIDA.

[0117] Como se detalla a continuación, una amplia variedad de fragmentos de anticuerpos y tecnologías miméticas de anticuerpos se han desarrollado y son ampliamente conocidos en la técnica. Si bien varias de estas tecnologías, como los anticuerpos de dominio, nanocuerpos y UniBodies hacen uso de fragmentos u otras modificaciones de las estructuras de anticuerpos tradicionales, también hay tecnologías alternativas, como adnectinas, afucuerpos, DARPs, Anticalinas, Avímeros y Versacuerpos que emplean estructuras de unión que, si bien imitan la unión de anticuerpos tradicional, se generan y funcionan a través de mecanismos distintos. Algunas de estas estructuras alternativas se revisan en Gill y Damle (2006) 17: 653-658. Todos los derivados y aglutinantes de anticuerpos mencionados anteriormente pueden mejorarse y/o seleccionarse mediante los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, los métodos conocidos en la técnica para generar nanocuerpos, cuerpos unitarios, adnectinas, anticuerpos, DARPs, anticalinas, avímeros y Versacuerpos pueden usarse para descubrir una proteína de unión inicial que luego puede servir como base para la generación de una biblioteca que puede ser producida y seleccionada de acuerdo con los métodos de la presente invención. Alternativamente, los aglutinantes ya conocidos en la técnica pueden usarse directamente para crear nuevas bibliotecas para uso con los métodos descritos en este documento.

[0118] En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento tendrán como objetivo la mejora de los anticuerpos de dominio (dAbs). Los anticuerpos de dominio son las unidades de unión funcional más pequeñas de los anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de dAbs VH y VL completamente humanas (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada biblioteca), y utiliza estas bibliotecas para seleccionar dAbs que son específicos para objetivos terapéuticos. A diferencia de muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamífero. Se pueden obtener detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y los métodos de producción de los mismos por referencia a la patente de los Estados Unidos 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; Número de serie de Estados Unidos 2004/0110941; Solicitud de patente europea n. ° 1433846 y patentes europeas 0368684 y 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

[0119] En otras realizaciones, los métodos descritos en el presente documento tendrán como objetivo la mejora de los nanocuerpos. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos naturales de cadena pesada. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante destacar que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad de unión a antígeno completa del anticuerpo de cadena pesada original. Los nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos y pueden humanizarse aún más sin ninguna pérdida de actividad. Es importante destacar que los nanocuerpos tienen un bajo potencial inmunogénico, lo que se ha confirmado en estudios de primates con compuestos de plomo de nanocuerpo.

[0120] Los nanocuerpos combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de fármacos de molécula pequeña. Al igual que los anticuerpos convencionales, los nanocuerpos muestran una alta especificidad diana, una alta afinidad por su objetivo y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, al igual que los fármacos de molécula pequeña, pueden inhibir las enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras del receptor. Además, Nanoanticuerpos son extremadamente estables, se pueden administrar por medios distintos de la inyección (véase, *p. ej.*, WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de nanocuerpos incluyen el reconocimiento de epítopos poco comunes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, unión en cavidades o sitios activos de objetivos proteicos con alta afinidad y selectividad debido a su flexibilidad tridimensional única, formato de fármaco, adaptación de la vida media y facilidad y rapidez del descubrimiento de drogas.

[0121] Los nanocuerpos están codificados por genes individuales y se producen eficientemente en casi todos los huéspedes procariontes y eucariotes, *p. ej.*, *E. coli* (véase, *p. ej.*, US 6,765,087), los moldes (por ejemplo *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, *p. ej.*, US 6,838,254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades de Nanocuerpos de varios kilogramos. Debido a que los nanocuerpos exhiben una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, pueden formularse como una solución lista para usar de larga duración. Por consiguiente, los métodos de la presente invención pueden usarse para mejorar la afinidad de los nanocuerpos por sus moléculas diana.

[0122] Los métodos conocidos en la técnica pueden usarse para generar nanocuerpos (u otros aglutinantes/inmunoaglutinantes descritos aquí). Dichos aglutinantes pueden servir entonces como base para la generación de una biblioteca que se puede producir y seleccionar de acuerdo con los métodos de la presente invención. Por ejemplo, el método Nanoclone (véase, *p. ej.*, WO 06/079372) es un método patentado para generar Nanoanticuerpos contra una diana deseada, en base a automatizado de alto a lo largo de la selección de las células

B y podría ser utilizado en el contexto de la invención instantánea. La selección exitosa de nanocuerpos del método Nanoclone puede proporcionar un conjunto inicial de nanocuerpos que pueden mejorarse aún más por los métodos descritos en este documento.

5 **[0123]** En otras realizaciones, los métodos descritos en el presente documento tendrán como objetivo la mejora de UniBodies. Los anticuerpos son otra tecnología de fragmentos de anticuerpos, sin embargo, esta se basa en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La eliminación de la región bisagra da como resultado una molécula que es esencialmente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. También es bien sabido que anticuerpos
10 IgG4 son inertes y por lo tanto no interactúan con el sistema inmune, lo cual puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en las que no se desea una respuesta inmune, y esta ventaja se pasa a UniBodies. Por ejemplo, UniBodies pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no matar, las células a las que están unidas. Además, la unión de UniBody a las células cancerosas no las estimula a proliferar. Además, debido a que los UniBodies tienen aproximadamente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden mostrar una mejor distribución
15 sobre tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Los UniBodies se eliminan del cuerpo a una velocidad similar a los anticuerpos IgG4 completos y pueden unirse con una afinidad similar por sus antígenos que los anticuerpos completos. Se pueden obtener más detalles de UniBodies haciendo referencia a la solicitud de patente WO2007/059782.

20 **[0124]** En otras realizaciones, los métodos descritos en el presente documento tendrán como objetivo la mejora de las moléculas de fibronectina o adnectina. Las moléculas de adnectina son proteínas de unión de ingeniería derivadas de uno o más dominios de la proteína de fibronectina (ver Ward M. y Marcey, D., callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/fibro/fibro.htm). Típicamente, la fibronectina está compuesta por tres módulos de proteínas diferentes, tipo I, tipo II y tipo III. Para una revisión de la estructura de función
25 de la fibronectina, ver Pankov y Yamada (2002) J Cell Sci.; 115 (Pt 20): 3861-3, Hohenester y Engel (2002) 21: 115-128, y Lucena et al. (2007) Invest Clin. 48: 249-262.

[0125] Dependiendo del tejido de origen, la fibronectina puede contener múltiples dominios de tipo III que pueden denotarse, *p. ej.*, ¹Fn3, ²Fn3, ³Fn3, etc. El dominio ¹⁰Fn3 contiene un motivo de unión a integrina y además contiene tres bucles que conectan las cadenas beta. Se puede considerar que estos bucles corresponden a los bucles de unión a antígeno de la cadena pesada de IgG, y se pueden alterar mediante los métodos discutidos a continuación para seleccionar moléculas de fibronectina y adnectina que se unen específicamente a un objetivo de interés. Las moléculas de adnectina a mejorar también pueden derivarse de polímeros de moléculas relacionadas con ¹⁰Fn3 en lugar de una estructura monomérica simple de ¹⁰Fn3.
35

[0126] Aunque el dominio ¹⁰Fn3 nativo se une típicamente a la integrina, las proteínas ¹⁰Fn3 adaptadas para convertirse en moléculas de adnectina se alteran para unirse a los antígenos de interés. En consecuencia, los métodos disponibles para el experto en la técnica pueden usarse para crear secuencias variantes y mutantes de ¹⁰Fn3 (formando así una biblioteca) que sea compatible con los métodos de la presente invención. Por ejemplo, las alteraciones en el ¹⁰Fn3 se pueden realizar por cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida al sitio, barajado de ADN u otros tipos de mutagénesis recombinacional a los que se ha hecho referencia en el presente documento. En un ejemplo, las variantes del ADN que codifica la secuencia ¹⁰Fn3 pueden sintetizarse directamente *in vitro*. Alternativamente, una secuencia natural de ¹⁰Fn3 puede ser aislada o clonada a partir del genoma usando métodos estándar (como la realizada, *p. ej.*, en la sol.
40 de patente de los Estados Unidos N° 20070082365), y luego mutada usando métodos de mutagénesis conocidos en la técnica.
45

[0127] En una realización, una proteína diana, puede inmovilizarse sobre un soporte sólido, tal como una resina de columna o un pozo en una placa de microtitulación. La diana luego se pone en contacto con una biblioteca de proteínas de unión potenciales o complejos de visualización X como se describe en el presente documento. La biblioteca puede comprender clones de ¹⁰Fn3 o moléculas de adnectina derivadas del tipo salvaje ¹⁰Fn3 por mutagénesis/aleatorización de la Secuencia ¹⁰Fn3 o mediante mutagénesis/aleatorización de las regiones del bucle ¹⁰Fn3 (no las cadenas beta). El proceso de selección/mutagénesis puede repetirse hasta que se obtengan aglutinantes con suficiente afinidad con la diana. Las moléculas de adnectina para usar en la presente invención pueden diseñarse usando la tecnología PROfusion™ empleada por Adnexus, una compañía de Briston-Myers Squibb. La tecnología PROfusion se ha creado en base a las técnicas referenciadas anteriormente (*p. ej.*, Roberts y Szostak (1997) 94: 12297-12302). Los métodos para generar bibliotecas de dominios ¹⁰Fn3 alterados y seleccionar ligantes apropiados que pueden usarse con la presente invención se describen completamente en los siguientes documentos de patente de EE.UU. y de solicitud de patente de EE.UU. N°s 7,115,396; 6,818,418; 6,537,749; 6,660,473; 7,195,880; 6,416,950; 6,214,553; 6623926; 6,312,927; 6,602,685; 6,518,018; 6,207,446; 6,258,558; 6,436,665; 6,281,344; 7,270,950; 6,951,725; 6,846,655; 7,078,197; 6,429,300; 7,125,669; 6,537,749; 6,660,473; y las solicitudes de patente de EE.UU. N°s 20070082365; 20050255548; 20050038229; 20030143616; 20020182597; 20020177158; 20040086980; 20040253612; 20030022236; 20030013160; 20030027194; 20030013110; 20040259155; 20020182687; 20060270604; 20060246059; 20030100004; 20030143616; y 20020182597. Ver también los métodos de las siguientes referencias: Lipovsek et al. (2007) Journal of Molecular Biology 368: 1024-1041; Sergeeva y col. (2006) Adv Drug Deliv Rev. 58: 1622-1654; Petty y col. (2007) Trends Biotechnol. 25: 7-15; Rothe y col. (2006) Expert Opin Biol Ther. 6: 177-187; y
50
55
60
65

Hoogenboom (2005) Nat Biotechnol. 23: 1105-1116.

[0128] Moléculas adicionales que pueden mejorarse usando los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, módulos de fibronectina humana $^{10}\text{Fn3}$ - $^9\text{Fn3}$ y $^{11}\text{Fn3}$ - $^{17}\text{Fn3}$, así como módulos de Fn3 relacionados de animales no humanos y procariotas. Además, también se pueden usar módulos Fn3 de otras proteínas con homología de secuencia con $^{10}\text{Fn3}$, tales como tenascinas y undulinas. Otras proteínas ejemplares que tienen pliegues de tipo inmunoglobulina (pero con secuencias que no están relacionadas con el dominio VH) incluyen N-cadherina, ICAM-2, titina, receptor de GCSF, receptor de citocina, inhibidor de glicosidasa, E-cadherina y cromoproteína antibiótica. Otros dominios con estructuras relacionadas pueden derivarse de la molécula de adhesión de membrana de mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC de clase I, receptor de antígeno de células T, dominios CD1, C2 e I-set de VCAM-1, pliegue de inmunoglobulina I-set de proteína C de unión a miosina, pliegue de inmunoglobulina I-set de proteína H de unión a miosina, pliegue de inmunoglobulina I-set de telokin, telikin, NCAM, twitchin, neuroglian, receptor de hormona de crecimiento, receptor de eritropoyetina, receptor de prolactina, receptor GC-SF, receptor de interferón gamma, beta-galactosidasa/glucuronidasa, beta-glucuronidasa y transglutaminasa. Alternativamente, cualquier otra proteína que incluya uno o más pliegues de tipo inmunoglobulina puede utilizarse para crear un resto de unión de tipo adnectina que puede mejorarse mediante los métodos descritos en este documento. Dichas proteínas pueden identificarse, por ejemplo, utilizando el programa SCOP (Murzin y col., J. Mol. Biol. 247: 536 (1995); Lo Conte y col., Nucleic Acids Res. 25: 257 (2000)).

[0129] En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden emplearse para mejorar las moléculas de anticuerpos. Las moléculas de anticuerpos representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteína de residuo de 58 aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG del estafilococo proteína A. Este dominio de paquete de tres hélices se ha utilizado como un andamiaje para la construcción de bibliotecas combinatorias de fagémidos, a partir de las cuales se pueden seleccionar las variantes de Aficuerpo que se dirigen a las moléculas deseadas utilizando la tecnología de visualización de fagos (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55). Las bibliotecas similares que pueden producirse mediante métodos conocidos en la técnica pueden seleccionarse usando la tecnología de visualización X descrita en este documento. La estructura simple y robusta de las moléculas Aficuerpo en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J Immunol Methods 2002;261:199-211) y para inhibir las interacciones del receptor (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7). Se pueden obtener más detalles de los Aficuerpos y métodos de producción de los mismos por referencia a la Patente de los Estados Unidos Núm. 5,831,012.

[0130] En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden emplearse para mejorar DARPins. Las DARPins (proteínas de repetición de anquirina diseñadas) son un ejemplo de una tecnología DRP (proteína de repetición de diseño) mimética de anticuerpos que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de los polipéptidos que no son anticuerpos. Las proteínas de repetición, como la anquirina o las proteínas de repetición ricas en leucina, son moléculas de unión ubicuas, que se producen, a diferencia de los anticuerpos, intra y extracelularmente. Su arquitectura modular única presenta unidades estructurales repetitivas (repeticiones), que se apilan juntas para formar dominios de repetición alargados que muestran superficies de unión a dianas variables y modulares. En base a esta modularidad, se pueden generar bibliotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño consensuado de repeticiones autocompatibles que muestran residuos superficiales variables y su ensamblaje aleatorio en dominios repetidos.

[0131] Las DARPins se pueden producir en sistemas de expresión bacterianos con rendimientos muy altos y pertenecen a las proteínas más estables conocidas. Altamente específicas, DARPins de alta afinidad a una amplia gama de proteínas diana, incluyendo receptores humanos, citoquinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de la membrana, han sido seleccionados. Se pueden obtener DARPins que tienen afinidades en el rango nanomolar a picomolar de un solo dígito.

[0132] Las DARPins se han usado en una amplia gama de aplicaciones, que incluyen ELISA, ELISA sandwich, análisis de citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de chips, purificación por afinidad o transferencia Western. Las DARPins también demostraron ser muy activas en el compartimento intracelular, por ejemplo, como proteínas marcadoras intracelulares fusionadas con la proteína verde fluorescente (GFP). Las DARPins se usaron además para inhibir la entrada viral con CI50 en el rango de pM. Las DARPins no solo son ideales para bloquear las interacciones proteína-proteína, sino también para inhibir las enzimas. Las proteasas, quinasas y transportadores se han inhibido con éxito, la mayoría de las veces en modo de inhibición alostérica. Los enriquecimientos muy rápidos y específicos en el tumor y las relaciones muy favorables de tumor a sangre hacen que las DARPins sean muy adecuadas para diagnósticos *in vivo* o enfoques terapéuticos.

[0133] Información adicional con respecto DARPins y otras tecnologías de DRP se puede encontrar en la Solicitud de

Patente de Estados Unidos publicación número 2004/0132028 y la Solicitud de Patente Internacional N° WO 02/20565.

[0134] En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden emplearse para mejorar las anticalinas. Las anticalinas son una tecnología mimética de anticuerpos adicional, sin embargo, en este caso, la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que se expresan de forma natural y abundante en tejidos y fluidos corporales humanos. Las lipocalinas han evolucionado para realizar una gama de funciones *in vivo* asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un β -barril muy conservado que soporta cuatro bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles forman la entrada a un bolsillo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula explican la variación en la especificidad de unión entre las lipocalinas individuales.

[0135] Si bien la estructura general de bucles hipervariables soportados por un marco de hoja β conservado es una reminiscencia de las inmunoglobulinas, lipocalinas difieren considerablemente de anticuerpos en términos de tamaño, se compone de un solo polipéptido de cadena de los 160-180 aminoácidos que es ligeramente más grande que un solo dominio de inmunoglobulina.

[0136] Las lipocalinas se clonan y sus bucles se someten a ingeniería para crear anticalinas. Se han generado bibliotecas de anticalinas estructuralmente diversas y la presentación de anticalina permite la selección y selección de la función de unión, seguido de la expresión y producción de proteína soluble para su posterior análisis en sistemas procariontes o eucariontes. Dichas bibliotecas de anticalina pueden emplearse de acuerdo con la tecnología de visualización X de la presente invención. Los estudios han demostrado con éxito que se pueden desarrollar anticalinas específicas para prácticamente cualquier proteína diana humana y se pueden obtener afinidades de unión en el rango nanomolar o superior.

[0137] Las anticalinas también pueden formatearse como proteínas de doble diana, las denominadas duocalinas. Una Duocalina se une a dos dianas terapéuticas separadas en una proteína monomérica fácilmente producida utilizando procesos de fabricación estándar, al tiempo que conserva la especificidad y afinidad de la diana, independientemente de la orientación estructural de sus dos dominios de unión. Las anticalinas seleccionadas por los métodos de la presente invención pueden ensamblarse en moléculas de duocalina.

[0138] La modulación de múltiples dianas a través de una sola molécula es particularmente ventajosa en enfermedades que se sabe que implican más de un factor causal. Además, los formatos de unión bivalentes o multivalentes, como las duocalinas, tienen un potencial significativo para atacar las moléculas de la superficie celular en la enfermedad, mediar los efectos agonistas en las vías de transducción de señales o inducir efectos de internalización mejorados mediante la unión y la agrupación de los receptores de la superficie celular. Además, la alta estabilidad intrínseca de las duocalinas es comparable a las anticalinas monoméricas, ofreciendo una formulación flexible y un potencial de administración para las duocalinas. Se puede encontrar información adicional con respecto a las anticalinas en la Patente de Estados Unidos N° 7,250,297 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 99/16873.

[0139] En otras realizaciones, los métodos de la presente invención se pueden emplear para mejorar Avímeros. Otra tecnología mimética de anticuerpos útil en el contexto de la presente invención son los Avímeros. Avímeros se evolucionaron a partir de una gran familia de dominios de receptor extracelular humano por barajado de exón *In Vitro* y presentación en fagos, generando proteínas de multidominio con propiedades de unión y de inhibición. Se ha demostrado que la vinculación de múltiples dominios de unión independientes crea avidez y da como resultado una afinidad y especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de unión de epítipo único convencionales. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficiente de moléculas específicas de múltiples dianas en *Escherichia coli*, la termoestabilidad mejorada y la resistencia a las proteasas. Se han obtenido avímeros con afinidades sub-nanomolares contra una variedad de dianas, y estos pueden mejorarse aún más por los métodos descritos en este documento.

[0140] Se puede encontrar información adicional sobre Avímeros en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

[0141] En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden emplearse para mejorar Versacuerpos. Los Versacuerpos son otra tecnología mimética de anticuerpos que podría usarse en el contexto de la presente invención. Los Versacuerpos son proteínas pequeñas de 3-5 kDa con >15% de cisteínas, que forman un andamio de alta densidad de disulfuro, que reemplaza el núcleo hidrofóbico que tienen las proteínas típicas. El reemplazo de una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, que comprende el núcleo hidrofóbico, con una pequeña cantidad de disulfuros da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrofílica (menos agregación y unión no específica), más resistente a las proteasas y al calor, y tiene una menor densidad de epítopos de células T, porque los residuos que más contribuyen a la presentación de MHC son hidrófobos. Es bien sabido que estas cuatro propiedades afectan la inmunogenicidad y, en conjunto, se espera que causen una gran disminución de la inmunogenicidad.

[0142] La inspiración para Versacuerpos proviene de los biofarmacéuticos inyectables naturales producidos por sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que se sabe que exhiben inesperadamente baja inmunogenicidad. Comenzando con familias de proteínas naturales seleccionadas, por diseño y por detección, el tamaño, la hidrofobicidad, el procesamiento del antígeno proteolítico y la densidad del epítipo se minimizan a niveles muy por debajo del promedio de las proteínas inyectables naturales.

[0143] Dada la estructura de Versacuerpos, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye multivalencia, especificidad múltiple, una diversidad de mecanismos de semivida, módulos de direccionamiento de tejidos y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, Versacuerpos pueden fabricarse en *E. coli* con altos rendimientos, y debido a su hidrofilia y tamaño pequeño, Versacuerpos son altamente solubles y pueden formularse a altas concentraciones. Los Versacuerpos son excepcionalmente estables al calor (se pueden hervir) y ofrecen una vida útil prolongada. Todas las cualidades de los aglutinantes descritos en este documento (p. ej., estabilidad al calor, estabilidad de la sal, vida útil, inmunogenicidad, afinidad diana, etc.) pueden mejorarse mediante los métodos de visualización y selección descritos en este documento (métodos de visualización X).

[0144] Se puede encontrar información adicional con respecto a Versacuerpos en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2007/0191272.

[0145] En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden emplearse para mejorar las moléculas SMIP™. SMIP™ (Small Modular ImmunoPharmaceuticals-Trubion Pharmaceuticals) diseñado para mantener y optimizar la unión a la diana, las funciones efectoras, la vida media *in vivo* y los niveles de expresión. SMIPs consta de tres dominios modulares distintos. Primero que contienen un dominio de unión que puede consistir en cualquier proteína que confiere especificidad (p. ej., receptores de superficie celular, anticuerpos monocatenarios, proteínas solubles, etc.). En segundo lugar, contienen un dominio de bisagra que sirve como un conector flexible entre el dominio de unión y el dominio efector, y también ayuda a controlar la multimerización del fármaco SMIP. Finalmente, SMIPs contiene un dominio efector que puede derivarse de una variedad de moléculas que incluyen dominios Fc u otras proteínas especialmente diseñadas. La modularidad del diseño, que permite la construcción simple de SMIP con una variedad de dominios de unión, bisagra y efecto diferentes, proporciona un diseño de fármaco rápido y personalizable. Los dominios de unión de las moléculas SMIP™ también pueden servir como base para una biblioteca adecuada para su visualización y selección de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento (p. ej., métodos de visualización X).

[0146] Se puede encontrar más información sobre SMIP, incluidos ejemplos de cómo diseñarlos, en Zhao et al. (2007) Blood 110: 2569-77 y las siguientes solicitudes de patentes de EE.UU. N^{os} 20050238646; 20050202534; 20050202028; 20050202023; 20050202012; 20050186216; 20050180970; y 20050175614.

[0147] La descripción detallada del fragmento de anticuerpo y las tecnologías miméticas de anticuerpos proporcionadas anteriormente no pretende ser una lista completa de todas las tecnologías que podrían usarse en el contexto de la especificación instantánea. Por ejemplo, y no a modo de limitación, una variedad de tecnologías adicionales que incluyen tecnologías alternativas basadas en polipéptidos, tales como fusiones de regiones determinantes complementarias como se describe en Qui et al., Nature Biotechnology, 25 (8) 921-929 (2007) podría usarse en el contexto de la presente invención.

[0148] Los complejos de visualización X (por ejemplo, fusiones de ácido nucleico-proteína o fusiones de ADN-proteína) que se describen en este documento pueden utilizarse para cualquier aplicación descrita o prevista para fusiones de ARN-proteína previamente. Los usos comerciales incluyen el aislamiento de polipéptidos con propiedades deseadas mediante técnicas de evolución *in vitro* (ver, por ejemplo, Szostak et al., Ser. de EE.UU. N^o 09/007,005 y Ser. de EE.UU. N^o 09/247,190; Szostak et al., WO98/31700; Roberts & Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1997) vol. 94, p. 12297-12302), selección de bibliotecas de ADNc que se derivan de ARNm celular (véase, por ejemplo, Lipovsek et al., Ser. de EE.UU. N^o 60/096,818, presentada el 17 de agosto de 1998), y la clonación de nuevos genes sobre la base de interacciones proteína-proteína (Szostak et al., Ser. de EE.UU. N^o 09/007,005 y US Ser No. 09,247,190; Szostak et al., WO98/31700), así como el uso de estas fusiones en experimentos de visualización de proteínas (Kuimelis et al. Ser. de EE.UU. N^o 60/080,686 y Ser. de EE.UU. N^o 09/282,734). Los complejos de visualización X (p. ej., fusiones de proteína de ADN) de la invención pueden usarse para cualquier aplicación previamente descrita o prevista para tecnologías de pantalla descritas previamente tales como las descritas en la patente de EE.UU. N^{os} 6,416,950; 6,429,300; 6,194,550; 6,207,446; y 6,214,553. Estos complejos de visualización X (p. ej., fusiones de ADN-proteína) se pueden utilizar para cualquier propósito apropiado terapéutico, de diagnóstico o de investigación, particularmente en las áreas farmacéutica y agrícola.

Aislamiento de nuevos catalizadores

[0149] La presente invención también puede usarse para seleccionar nuevas proteínas catalíticas. La selección y evolución *in vitro* se ha usado previamente para el aislamiento de nuevos ARN y ADN catalíticos, y, en la presente invención, se usa para el aislamiento de nuevas enzimas proteicas (un ejemplo no limitante, meramente provisto para ilustración, son enzimas adecuadas para llevar a cabo el metabolismo de los polímeros de entrada en subproductos

más pequeños e inmediatamente más útiles, como para convertir los polisacáridos en biocombustibles más útiles). En un ejemplo particular de este enfoque, un catalizador puede aislarse indirectamente seleccionando para unirse a un análogo químico del estado de transición del catalizador. En otro ejemplo particular, el aislamiento directo puede llevarse a cabo seleccionando la formación de enlace covalente con un sustrato (por ejemplo, usando un sustrato unido a una etiqueta de afinidad) o mediante escisión (por ejemplo, seleccionando la capacidad de romper un enlace específico y de ese modo liberar miembros catalíticos de una biblioteca de un soporte sólido).

[0150] Este enfoque para el aislamiento de nuevos catalizadores tiene al menos dos ventajas importantes sobre la tecnología del anticuerpo catalítico (revisado en Schultz et al., J. Chem. Engng. News 68:26 (1990)). Primero, en la tecnología de anticuerpos catalíticos, el conjunto inicial generalmente se limita al pliegue de inmunoglobulina; en contraste, la biblioteca inicial de complejos de visualización X (fusiones de proteínas de ADN) puede ser completamente aleatoria o puede consistir, sin limitación, en variantes de estructuras enzimáticas o estructuras de proteínas conocidas. Además, el aislamiento de anticuerpos catalíticos generalmente se basa en una selección inicial para unirse a los análogos de reacción en estado de transición seguido de una laboriosa selección de anticuerpos activos; de nuevo, en contraste, la selección directa para la catálisis es posible usando un enfoque de biblioteca de visualización X, como se demostró previamente usando bibliotecas de ARN. En un enfoque alternativo para aislar enzimas proteicas, se pueden combinar los enfoques de selección directa y análogo de estado de transición.

[0151] Las enzimas obtenidas por este método son muy valiosas. Por ejemplo, actualmente existe una necesidad apremiante de catalizadores industriales novedosos y efectivos que permitan desarrollar procesos químicos mejorados. Una ventaja principal de la invención es que las selecciones pueden llevarse a cabo en condiciones arbitrarias y no están limitadas, por ejemplo, a condiciones *in vivo*. Por lo tanto, la invención facilita el aislamiento de nuevas enzimas o variantes mejoradas de enzimas existentes que pueden llevar a cabo transformaciones altamente específicas (y, por lo tanto, minimizar la formación de subproductos no deseados) mientras funcionan en entornos predeterminados, por ejemplo, entornos de temperatura, presión o concentración disolvente elevadas.

Una trampa de interacción *in vitro*.

[0152] La tecnología de visualización X también es útil para explorar bibliotecas de ADNc y clonar nuevos genes sobre la base de interacciones proteína-proteína. Mediante este método, una genoteca de ADNc se genera a partir de una fuente deseada (por ejemplo, por el método de Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons y Greene Publishing Company,. 1994; en particular, véase el Capítulo 5). Cada uno de los ADNc candidatos pueden formularse en un complejo de visualización X (*p. ej.*, una proteína de fusión del ADN) utilizando las técnicas descritas en el presente documento, y se ensaya la capacidad de estos complejos (o versiones mejoradas de las fusiones) para interactuar con moléculas particulares.

[0153] El hecho de que la etapa de interacción se lleva a cabo *in vitro* permite el control cuidadoso de la rigurosidad de reacción, usando el competidor no específico, la temperatura y las condiciones iónicas. La alteración de moléculas pequeñas normales con análogos no hidrolizables (*p. ej.*, ATP vs. ATPgS) permite selecciones que discriminan entre diferentes conformeros de la misma molécula. Este enfoque es útil tanto para la clonación como para la identificación funcional de muchas proteínas, ya que la secuencia de ácido nucleico del compañero de unión seleccionado está asociada y, por lo tanto, puede aislarse fácilmente. Además, la técnica es útil para identificar funciones e interacciones de cualquier gen humano.

[0154] El método también se puede usar para desarrollar o mejorar ligandos de polipéptidos para una vida media, afinidad o solubilidad mejoradas. Los complejos de visualización X (*p. ej.*, fusiones de ADN-proteína) descritos en este documento pueden usarse en cualquier método de selección para proteínas deseadas, incluyendo la evolución molecular y los enfoques de reconocimiento. Ejemplos de métodos de selección se describen, por ejemplo, en Szostak et al., Ser. de EE.UU. N° 09/007,005 y Ser. de EE.UU. N° 09/247,190; Szostak y col., WO98/31700; Roberts y Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1997) vol. 94, p. 12297-12302; Lipovsek y col., Ser. de EE.UU. 60/096,818 y Ser. de EE.UU. N° 09/374,962; y Kuimelis et al. Ser. de EE.UU. 60/080,686 y Ser. de EE.UU. N° 09/282,734. Generación de Biblioteca, Cribado y Maduración de Afinidad.

[0155] En algunas realizaciones, bibliotecas de péptidos o de genes se pueden cribar para identificar péptidos que tienen cualidades deseadas (*p. ej.*, unión a un antígeno particular) o los que se han mejorado o modificado de acuerdo con los métodos de la invención. En realizaciones relacionadas, un péptido particular producido o seleccionado por los métodos descritos en el presente documento puede alterarse adicionalmente por maduración por afinidad o mutagénesis, produciendo así una biblioteca de péptidos o ácidos nucleicos relacionados. Como tal, un aspecto de la invención puede implicar la exploración de grandes bibliotecas para identificar péptidos potenciales (o ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos) que tienen cualidades deseables, como la capacidad de unir un antígeno, una mayor afinidad de unión, etc. Cualquier método para la generación de bibliotecas y la selección de dianas conocidas en la técnica o descritas en este documento pueden usarse de acuerdo con la presente invención.

[0156] Los métodos de generación de bibliotecas conocidos en la técnica, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento (*p. ej.*, por la adición de las etiquetas apropiadas, secuencias complementarias, etc.) pueden ser empleados para crear bibliotecas adecuadas para su uso con los métodos descritos en este documento. Algunos

métodos para la generación de bibliotecas se describen en Ser. de EE.UU. N° 09/007,005 y 09/247,190; Szostak y col., WO989/31700; Roberts y Szostak (1997) 94: 12297-12302; Ser. de EE.UU. N° 60/110,549, Ser. de EE.UU. N° 09/459,190, y WO 00/32823.

5 **[0157]** En una realización, la biblioteca comprenderá dominios VH, preferiblemente dominios VH humanos. Cualquier célula puede usarse como fuente para una biblioteca. En algunas realizaciones preferidas, la fuente de células para la biblioteca puede ser Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC), esplenocitos o células de médula ósea (*p. ej.*, vea la Figura 36 que describe la diversidad de biblioteca VH que se puede obtener en una biblioteca de ciertos tipos de células donantes).

10 **[0158]** Se entenderá por un experto en la técnica que los métodos de la presente invención se pueden emplear en una forma iterativa. Por ejemplo, el ácido nucleico o la proteína seleccionados por uno de los métodos descritos aquí pueden servir como base para la generación de una nueva biblioteca a partir de la cual el proceso puede comenzar de nuevo. Un ejemplo de tal esquema se ilustra en la Figura 22, en donde los productos de una ronda de selección se usan para regenerar una nueva biblioteca.

15 **[0159]** La metodología de presentación en X descrita en este documento puede llevarse a cabo en condiciones tales que los enlaces disulfuro intramoleculares estén presentes en los péptidos durante las selecciones. En otras realizaciones, la formación de enlaces disulfuro puede prevenirse, si se desea. Se puede obtener una biblioteca inicial mediante, *p. ej.*, la utilización de la síntesis directa de ADN, mediante mutagénesis *in vitro* o *in vivo*, o cualquier biblioteca de partida disponible conocida en la técnica. Por ejemplo, las bibliotecas y los métodos para hacer dichas bibliotecas descritos en las referencias citadas en el presente documento, y en las siguientes referencias pueden usarse de acuerdo con la presente invención: la patente de EE.UU. N°s 5,922,545, 7,074,557.

20 **[0160]** En realizaciones preferidas, la biblioteca es una biblioteca VH o VL. La Tabla 2 proporciona un conjunto no limitante de cebadores de ejemplo que pueden usarse para amplificar dominios VH.

Tabla 2. Cebadores ejemplares para la generación de la biblioteca de visualización X del dominio VH. R = A/G, Y = C/T, K = G/T, M = A/C, S = G/C, W = A/

30

| Región diana | Detalles de cebadores | Secuencia de cebadores | SEQ ID No: |
|------------------------------|-------------------------------|--|------------|
| C \square 1 | IgM, síntesis de ADNc, 21 mer | ACAGGAGACGAGGGGGAAAAG | 1. |
| C \square 1 | IgG, síntesis de ADNc, 20 mer | GCCAGGGGAAGACCGATGG | 2. |
| C \square 1 | IgA, síntesis de ADNc, 22 mer | GAGGCTCAGCGGAAGACCTT G | 3. |
| C \square 1 | Vk, síntesis de ADNc, 21 mer | CAACTGCTCATCAGATGGCGG | 4. |
| C \square 1 | VI, síntesis de ADNc, 21 mer | CAGTGTGGCCTTGTGGCTTG | 5. |
| C \square 2 | PCR 3' IgM, 21 mer | GGTTGGGGCGGATGCACTCCC | 6. |
| C \square 2 | PCR 3' IgG, 21 mer | CGATGGGCCCTTGGTGGARGC | 7. |
| C \square 2 | PCR 3' IgA, 21 mer | CTTGGGGCTGGTCGGGGATGC | 8. |
| C \square 2 | PCR 3' Vk, 21 mer | AGATGGTGCAGCCACAGTTTCG | 9. |
| J \square 1-3C \square 2 | PCR 3' VI, 42 mer | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGGACGGT SASCTTGGTCCC | 10. |
| J \square 7C \square 2 | PCR 3' VI, 42 mer | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGGAGGACGGT CAGCTGGGTGCC | 11. |
| VH1a | PCR5' VH1, 46 mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTK CAGCTGGTGCAGTCTG | 12. |
| VH1b | PCR5' VH1, 46 mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCC AGCTTGTGCAGTCTG | 13. |
| VH1c | PCR5' VH1, 46 mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGSAGGTCC AGCTGGTACAGTCTG | 14. |
| VH1d | PCR5' VH1, 46 mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCARATGC AGCTGGTGCAGTCTG | 15. |
| VH2 | PCR5' VH2, 46 mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGRTCA CCTGAAGGAGTCTG | 16. |

65

ES 2 752 025 T3

(continuación)

| Región diana | Detalles de cebadores | de | Secuencia de cebadores | SEQ ID No: |
|--------------|-----------------------|-----------|---|------------|
| 5 | VH3a | PCR5' mer | VH3, 46 CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTG CAGCTGGTGGAGTCTG | 17. |
| 10 | VH3b | PCR5' mer | VH3, 46 CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTG CAGCTGGTGGAGTCTG | 18. |
| 15 | VH3c | PCR5' mer | VH3, 46 CAATTACTATTTACAATTACAATGGAGGTG CAGCTGTTGGAGTCTG | 19. |
| | VH4a | PCR5' mer | VH4, 42 CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGSTGC AGCTGCAGGAG | 20. |
| 20 | VH4b | PCR5' mer | VH4, 45 CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTG CAGCTACAGCAGTGG | 21. |
| | VH5 | PCR5' mer | VH5, 46 CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTG CAGCTGGTGCAGTCTG | 22. |
| 25 | VH6 | PCR5' mer | VH6, 46 CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTA CAGCTGCAGCAGTCAG | 23. |
| 30 | VH7 | PCR5' mer | VH7, 46 CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTG CAGCTGGTGAATCTG | 24. |
| | enlaceVk1 a | PCR5' mer | VK1, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG RACATCCAGATGACCCAG | 25. |
| 35 | enlaceVk1b | PCR5' mer | VK1, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GMCATCCAGTTGACCCAG | 26. |
| | enlaceVk1c | PCR5' mer | VK1, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GCCATCCRGATGACCCAG | 27. |
| 40 | enlaceVk1d | PCR5' mer | VK1, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GTCATCTGGATGACCCAG | 28. |
| 45 | enlaceVk2a | PCR5' mer | VK2, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GATATTGTGATGACCCAG | 29. |
| | enlaceVk2b | PCR5' mer | VK2, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GATRTTGTGATGACTCAG | 30. |
| 50 | enlaceVk3 a | PCR5' mer | VK3, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GAAATTGTGTTGACRCAG | 31. |
| | enlaceVk3 a | PCR5' mer | VK3, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GAAATAGTGATGACGCAG | 32. |
| 55 | enlaceVk3 a | PCR5' mer | VK3, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GAAATTGTAATGACACAG | 33. |
| 60 | enlaceVk4 | PCR5' mer | VK4, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GACATCGTGATGACCCAG | 34. |
| 65 | enlaceVk5 | PCR5' mer | VK5, 48 GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GAAACGACACTCACGCAG | 35. |

(continuación)

| | Región diana | Detalles de cebadores | Secuencia de cebadores | SEQ ID No: |
|----|--------------|-----------------------|--|------------|
| 5 | enlaceVk6a | PCR5' VK6, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GAAATTGTGCTGACTCAG | 36. |
| 10 | enlaceVk6b | PCR5' VK6, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GATGTTGTGATGACACAG | 37. |
| | enlaceVL1a | PCR5' VL1, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGTCTGTGCTGACKCAG | 38. |
| 15 | enlaceVL1b | PCR5' VL1, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGTCTGTGYTGACGCAG | 39. |
| | enlaceVL2 | PCR5' VL2, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGTCTGCCCTGACTCAG | 40. |
| 20 | enlaceVL3a | PCR5' VL3, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG TCCTATGWGCTGACTCAG | 41. |
| 25 | enlaceVL3b | PCR5' VL3, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG TCCTATGAGCTGACACAG | 42. |
| | enlaceVL3c | PCR5' VL3, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG TCTTCTGAGCTGACTCAG | 43. |
| 30 | enlaceVL3d | PCR5' VL3, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG TCCTATGAGCTGATGCAG | 44. |
| 35 | enlaceVL4 | PCR5' VL4, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGCYTGTGCTGACTCAA | 45. |
| | enlaceVL5 | PCR5' VL5, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGSCTGTGCTGACTCAG | 46. |
| 40 | enlaceVL6 | PCR5' VL6, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG AATTTTATGCTGACTCAG | 47. |
| | enlaceVL 7 | PCR5' VL7, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGRCTGTGGTGACTCAG | 48. |
| 45 | enlaceVL8 | PCR5' VL8, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGACTGTGGTGACCCAG | 49. |
| 50 | enlaceVL4/9 | PCR5' VL4/9, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CWGCCTGTGCTGACTCAG | 50. |
| 55 | enlaceVL 10 | PCR5' VL10, 48 mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGGCAGGGCTGACTCAG | 51. |

[0161] En realizaciones preferidas, las construcciones de ácido nucleico de la biblioteca contienen el promotor T7. Los ácidos nucleicos en la biblioteca pueden manipularse por cualquier medio conocido en la técnica para agregar promotores, potenciadores, espaciadores o etiquetas apropiados que sean útiles para la producción, selección o purificación del ácido nucleico, su producto de traducción o la complejo de visualización X. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las secuencias en la biblioteca pueden incluir un potenciador de TMV, secuencias que codifican una etiqueta FLAG, una secuencia de visualización SA o una secuencia o señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, las secuencias de la biblioteca de ácido nucleico pueden incluir además una etiqueta fuente única para identificar la fuente de la secuencia de ARN o ADN. En algunas realizaciones, las secuencias de la biblioteca de ácido nucleico pueden incluir una etiqueta de grupo. Una etiqueta de grupo se puede usar para identificar a la secuencia seleccionada durante una ronda particular de selección. Esto permitirá, por ejemplo, que las secuencias de múltiples

rondas de selección se agrupan y se secuencian en una sola ejecución sin perder la pista de la ronda de selección de la que se originaron.

5 **[0162]** La biblioteca de ADN bicatenario se transcribe luego *in vitro* y se asocia, como se describe en el presente documento, a un aceptor de péptidos. En una realización preferida, un enlazador NA o un enlazador NA unidos a un ligando de alta afinidad (*p. ej.*, un enlazador NA biotinilado) se hibrida (*p. ej.*, DDB-1). En algunas realizaciones, el enlazador de NA se reticula por fotocross al ARNm. En realizaciones particulares, un aceptor de ligando, *p. ej.*, estreptavidina, luego se carga. En realizaciones adicionales, un segundo ligando de alta afinidad que está unido a un aceptor de péptido está unido a la estreptavidina. En algunas realizaciones, el segundo aceptor de ligando/péptido de alta afinidad es un conector de biotina-puromicina, por ejemplo, BPP. La traducción *in vitro* puede llevarse a cabo en donde el aceptor de péptidos reacciona con el producto de traducción naciente.

15 **[0163]** El resultado, después de la purificación, es una biblioteca de complejos de visualización X de péptido-ácido nucleico. Dichos complejos de visualización X pueden experimentar una transcripción inversa después de purificarse en realizaciones preferidas. Los complejos de visualización X se pueden purificar por cualquier método conocido en la técnica, *p. ej.*, mediante cromatografía de afinidad, cromatografía en columna, centrifugación en gradiente de densidad, captura de etiqueta de afinidad, etc. En una realización preferida, se emplea una purificación de celulosa oligo-dT en la que el complejo de visualización X se ha diseñado para incluir un ARNm con una cola poli-A. En tales realizaciones, oligo-dT se une covalentemente a la celulosa en la columna o dispositivo de purificación. El oligo-dT participa en un emparejamiento de bases complementario con la cola poli-A del ARNm en el complejo de visualización X, lo que impide su progreso a través del dispositivo de purificación. El complejo de visualización X puede eluirse más tarde con agua o tampón.

25 **[0164]** La transcripción inversa genera un híbrido de ADNc/ARN, que está unido de forma no covalente al péptido transcrito a través de la asociación con el conector NA, el ligando de alta afinidad, el receptor de ligando, el receptor de péptido (posiblemente unido a un segundo ligando de alta afinidad), o alguna combinación operable de los mismos.

30 **[0165]** El complejo de visualización X purificado resultante puede tratarse con ARNasa para degradar el ARNm restante, seguido de síntesis de la segunda cadena de ADN para generar un ADNc completo. Tenga en cuenta que, en una realización preferida, los ácidos nucleicos en el conector NA pueden servir como un cebador para la transcripción inversa. En consecuencia, el ADNc permanece unido al ligando de alta afinidad y parte del complejo de visualización X.

35 **[0166]** El complejo de visualización X se puede purificar adicionalmente si, como se contempla, el complejo de visualización X está diseñado para contener una etiqueta. Cualquier etiqueta conocida en la técnica puede usarse para purificar el complejo de visualización X. Por ejemplo, es posible usar una etiqueta FLAG, myc tac, etiqueta de histidina (etiqueta His) o etiqueta HA, entre otras. En realizaciones preferidas, una secuencia que codifica una etiqueta FLAG se manipula en la secuencia de ADN original de modo que la proteína transcrita final contenga la etiqueta FLAG.

40 **[0167]** El complejo de visualización X resultante se selecciona luego usando cualquier método de selección conocido en la técnica. En realizaciones preferidas se usa la selección por afinidad. Por ejemplo, el objetivo o antígeno de unión deseado puede inmovilizarse en un soporte sólido para usar en una columna de afinidad. Ejemplos de métodos útiles en cromatografía de afinidad se describen en la patente de EE.UU. N^{os} 4,431,546, 4,431,544, 4,385,991, 4,213,860, 4,175,182, 3,983,001, 5,043,062. La actividad de unión puede evaluarse mediante inmunoensayo estándar y/o cromatografía de afinidad. La detección de complejos de visualización X para la función catalítica, *p. ej.*, la función proteolítica se puede lograr utilizando un ensayo de placa de hemoglobina estándar como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N^o 5,798,208. La determinación de la capacidad de los péptidos candidatos (*p. ej.*, anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, etc.) para unirse a dianas terapéuticas se puede analizar *in vitro* utilizando, por ejemplo, un instrumento Biacore, que mide las tasas de unión de un anticuerpo a una diana determinada o antígeno.

50 **[0168]** En realizaciones preferidas, los complejos de visualización X seleccionados pueden identificarse mediante secuenciación del componente de ADN. Se puede emplear cualquier tecnología de secuenciación conocida en la técnica, por ejemplo, secuenciación 454, secuenciación Sanger, secuenciación por síntesis o los métodos descritos en la patente de EE.UU. N^{os} 5547835, 5171534, 5622824, 5674743, 4811218, 5846727, 5075216, 5405746, 5858671, 5374527, 5409811, 5707804, 5821058, 6087095, 5876934, 6258533, 5149625.

60 **[0169]** En algunas realizaciones, la selección se puede realizar varias veces para identificar aglutinantes de mayor afinidad, y puede implementarse con aglutinantes competitivos o condiciones de lavado más estrictas. Un experto en la materia apreciará que pueden emplearse variantes del procedimiento descrito aquí.

[0170] En una realización preferida, los métodos de la presente invención se llevan a cabo como se representa en la Figura 14.

65 **[0171]** En otras realizaciones preferidas, el complejo de visualización X está diseñado como se representa en la Figura 13 o la Figura 16.

Composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos o miméticos de los mismos de la divulgación

5 **[0172]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, *p. ej.*, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de los péptidos (*p. ej.*, dos o más péptidos diferentes) generada por los métodos de la invención, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la descripción también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, en combinación con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un péptido o mimético del mismo de la descripción combinada con otros agentes farmacéuticos apropiados útiles para tratar una enfermedad o indicación particular.

10 **[0173]** Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o administración epidérmica (*p. ej.*, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir, el péptido o mimético del mismo de la descripción puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

15 **[0174]** Los compuestos farmacéuticos de la descripción pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto original y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase *p. ej.*, Berge, SM, et al. (1977) J. Pharm. Sci 66: 1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos de fenilo sustituido alcanoico, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como aminas orgánicas no tóxicas, como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina., etilendiamina, procaína y similares.

20 **[0175]** En una realización particular, los péptidos o miméticos de los mismos seleccionados por los métodos de la invención pueden ser disueltos en agua con cloruro de sodio para lograr condiciones fisiológicas de sal isotónica.

25 **[0176]** Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

30 **[0177]** Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

35 **[0178]** Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

40 **[0179]** Las formas de dosificación sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y capas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberan los ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retrasada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Los péptidos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más excipientes.

45 **[0180]** Las composiciones terapéuticas típicas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido,

y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0181] Una composición formulada como una solución puede hacerse adecuada para la administración mediante gotero en el ojo, *p. ej.*, preparando la solución para contener la cantidad apropiada de sales.

[0182] Los liposomas que contienen un péptido o mimético del mismo seleccionado por los métodos de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con cualquiera de los métodos bien conocidos tales como los descritos por Epstein et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82: 3688-3692 (1985)), Hwang y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 4030-4034 (1980)), EP 52,322, EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Sol. de Pat. japonesa 83-118008 y EP 102,324, así como la patente de EE.UU. N^{os} 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas pueden ser de tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en el que el contenido de lípidos es mayor de aproximadamente 10 mol. por ciento de colesterol, preferiblemente en un rango de 10 a 40 mol. por ciento de colesterol, la proporción seleccionada se ajusta para una terapia óptima de péptidos. Sin embargo, como entenderán los expertos en la materia al leer esta descripción, también se pueden usar vesículas de fosfolípidos distintas de los liposomas.

[0183] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración por esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

[0184] La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una sola forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad oscilará entre aproximadamente el 0,01 por ciento y aproximadamente el noventa y nueve por ciento del ingrediente activo, preferiblemente entre aproximadamente el 0,1 por ciento y aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente entre aproximadamente el 1 por ciento y aproximadamente el 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0185] Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (*p. ej.*, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la divulgación están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

[0186] Para la administración del péptido o mimético del mismo de la descripción, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un resto de la descripción incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosis, entonces cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

[0187] Alternativamente, el péptido o mimético del mismo seleccionado por los métodos de la descripción se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían según la vida media de la sustancia administrada en el paciente. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En

aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

[0188] Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos y las moléculas pequeñas en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleada, o el éster, sal o amida de la misma, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se trata, y como factores bien conocidos en las artes médicas.

[0189] Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un péptido o mimético del mismo seleccionado por los métodos de la invención preferiblemente da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención de discapacidad debido a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferiblemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 10% o 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente 60%, y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente 80% en relación con sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, tal inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la técnica podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

[0190] Una composición de la presente descripción se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías preferidas de administración para los restos de unión a la divulgación incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal o otros parenterales, por ejemplo por inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, inyección e infusión subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

[0191] Alternativamente, un péptido o mimético del mismo de la descripción se puede administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

[0192] Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Ver, *p. ej.*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

[0193] Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la divulgación se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: Patente de los Estados Unidos Núm. 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; Patente de Estados Unidos N° 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente de Estados Unidos N° 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; Patente de Estados Unidos N° 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro continuo de fármacos; Patente de Estados Unidos N° 4,439,196, que describe un sistema de suministro de fármacos osmóticos que tiene compartimentos multicámara; y la Patente de Estados Unidos N° 4,475,196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

[0194] La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

5 **EJEMPLIFICACIÓN**

[0195] A lo largo de los ejemplos, se utilizaron los siguientes materiales y métodos a menos que se indique lo contrario.

Materiales y métodos

10 [0196] En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario; técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, la tecnología PCR, inmunología (especialmente, *p. ej.*, tecnología de anticuerpo), sistemas de expresión (*p. ej.*, la expresión libre de células, presentación en fagos, presentación en ribosomas, y Profusion), y cualquier cultivo celular necesario que esté dentro de la habilidad de la técnica y se explique en la literatura. Ver, *p. ej.* Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *DNA Cloning*, Vols. 1 y 2 (DN Glover, Ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, Ed. 1984); *PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, Ed. John Wiley & Sons (1999) (Editor); *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, Neidle, Ed., Oxford Univ Press (1999); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., Academic Press (1990); *PCR Essential Techniques: Essential Techniques*, Burke, Ed., John Wiley & Son Ltd (1996); *Ike PCR Technique: RT-PCR*, Siebert, Ed., Eaton Pub. Co. (1998); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Bioogy)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992); *Large-Scale Mammalian Cell; Culture Technology*, Lubiniecki, A., Ed., Marcel Dekker, Pub., (1990).

20 [0197] Las composiciones y métodos de la divulgación pueden, en algunas realizaciones, usarse junto con los de cualquier otro sistema de visualización *in vitro* reconocido en la técnica, por ejemplo, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 7,195,880; 6,951,725; 7,078,197; 7,022,479; 6,518,018; 7,125,669; 6,846,655; 6,281,344; 6,207,446; 6,214,553; 6,258,558; 6,261,804; 6,429,300; 6,489,116; 6,436,665; 6,537,749; 6,602,685; 6,623,926; 6,416,950; 6,660,473; 6,312,927; 5,922,545; 6,194,550; 6,207,446; 6,214,553; y 6,348,315.

EJEMPLOS

35 [0198] La presente descripción se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes adicionales.

EJEMPLO 1

40 **DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE ANTICUERPOS NAIVE**

Fuentes de células

45 [0199] El ARNm se obtuvo de médula ósea completa (10 donantes), esplenocitos (13 donantes) y células mononucleares periféricas (601 donantes) de un total de 624 individuos sanos diferentes, para asegurar la diversidad de la biblioteca. La diversidad calculada de la biblioteca de VH es 10^9 - 10^{10} y la biblioteca de VL es 10^6 - 10^7 .

Construcción de la biblioteca

50 [0200] Se usó RT-PCR para la construcción de la biblioteca VH y VL.

[0201] La primera cadena de ADNc se sintetizó usando cebadores específicos de las regiones constantes de la cadena H de IgM, IgG y IgA (C□1, C□1 y C□1) y las regiones constantes de la cadena L de kappa y lambda (C□1 y C□□).

55 [0202] Para la construcción de la biblioteca de cadena H variable, se diseñaron cebadores de sentido múltiple (cebadores degenerados) a partir de regiones FR1 de miembros de la familia VH1-7 con una secuencia UTR aguas arriba (VH1-7UTR). Los cebadores antisentido para VH se diseñaron a partir de las regiones constantes anidadas a los cebadores para la síntesis de ADNc (C□2, C□2 y C□2). Para la construcción de la biblioteca de cadena ligera variable, se diseñaron cebadores de sentido múltiple a partir de las regiones V□ y V□ FR1 de cada familia con 12 aminoácidos aguas arriba de la secuencia enlazadora para permitir la combinación aleatoria de Fv de cadena única. Los cebadores antisentido para la amplificación del gen □ y □ se diseñaron a partir de las regiones constantes anidadas en C□1 (C□2) o J□ con el mismo C□2 aguas abajo (J□C□2). El scFv ensamblado de todas las familias de IgM e IgG tendrá las mismas secuencias de C□2 en el extremo posterior si es necesario.

65 [0203] Para la construcción de la biblioteca de VH, la PCR se realizó con C□2, C□2 y C□2 y VH1-7 UTR como pares

individuales para las tres fuentes de células B y gel purificado. Después de la purificación, las familias individuales amplificadas a partir de 3 fuentes se agruparon y generaron 7 bibliotecas IgM (VH1-7), 7 bibliotecas IgG (VH1-7) y 7 bibliotecas IgA (VH1-7). Para la construcción de la biblioteca VL, la PCR se realizó con mezcla de C \square 2 y V \square o J \square C \square 2 y V \square para 3 fuentes de células B. Después de la purificación en gel, se agruparon las bibliotecas V \square y V \square de diferentes fuentes para generar bibliotecas V \square y V \square .

Modificación de la biblioteca

10 **[0204]** Las bibliotecas de IgM, IgG, IgA VH y bibliotecas VL también se modificaron para transportar la transcripción *in vitro*, las secuencias de señal de traducción en el extremo 5' y las secuencias de etiqueta en el extremo 3'. Estas bibliotecas de VH están listas para convertirse en bibliotecas de visualización de estreptavidina.

Secuencias de oligo para la construcción de la biblioteca

15 **[0205]** Los cebadores de oligonucleótidos expuestos en la Tabla 2 se usaron para generar bibliotecas de visualización X VH y VL.

EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN Y USO DE BIBLIOTECAS DE VISUALIZACIÓN DE ESTREPTAVIDINA

[0206] Este ejemplo describe la producción y el uso de las bibliotecas de visualización de estreptavidina de la invención.

25 *Materiales y métodos*

[0207] En general, la práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, *p. ej.*, tecnología de anticuerpos), y técnicas estándar de preparación de polipéptido. Ver, *p. ej.*, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons 1992).

35 *Tampones*

[0208] Tampón de ligación química 10X: 250 mM Tris pH 7 y NaCl 1 M
 Tampón de unión oligo dT 1X: 100 mM Tris pH 8, NaCl 1 M, y 0,05% de Triton X-100
 Tampón de unión oligo dT 2X: 200 mM Tris pH 8, NaCl 2M, y 0,1% de Triton X-100
 40 tampón de unión de bandera 1X: 50 mM HEPES, NaCl 150 mM, y 0,025% Triton X-100 o
 1X PBS y 0,025% Triton X-100
 tampón de unión de bandera 5X: 250 mM HEPES, 750 mM NaCl, y 0,125% de Triton X-100 o 5X PBS y 0,125% de
 Triton X-100

45 *Fuente de reactivos usados*

[0209] Megascript T7: Ambion (Austin, TX) PH 1334
 Retic lysate IVT: Ambion (Austin, TX) PH1200
 UC Master mix -met: Ambion (Austin, TX) PH 1223G
 50 Superscript II RNaseH- RT: Invitrogen (Carlsbad, CA) #18064-014
 NAP-25 column: Amersham Pharmacia Biotech (Sunnyvale, CA) #17-0852-01
 Oligo dT cellulose Type 7: Amersham Pharmacia Biotech (Sunnyvale, CA) #27-5543-03
 Anti-flag M2 agarose affinity gel: Sigma (St. Louis, MO) #A2220
 Flag peptide: Sigma (St. Louis, MO) #F3290
 55 dNTP: Amersham Pharmacia Biotech (Sunnyvale, CA) #27-2035-01
 Herculase Hotstart DNA polymerase: Stratagene (La Jolla, CA) 600312-51
 Mini spin column: Biorad (Hercules, CA) #732-6204
 Ultrapure BSA: Ambion (Foster City, CA) #2616
 Sheared salmon sperm DNA: Ambion (Foster City, CA) #9680
 60 Linkers: PBI, DDB, BPP: Trilink BioTechnologies, Inc. (San Diego, CA)
 H₂O: OmniPur (Gibbstown, NJ) #9610
 2M KCl: Usb (Cleveland, OH) #75896
 1M MgC12: Usb (Cleveland, OH) #78641
 0.5M EDTA: Usb (Cleveland, OH) #15694
 65 1M Tris pH8: Usb (Cleveland, OH) #22638
 1M Tris pH7: Usb (Cleveland, OH) #22637

5M NaCl: Usb (Cleveland, OH) #75888
 1M HEPES: Usb (Cleveland, OH) #16924
 Qiaquick gel extraction kit: Qiagen (Valencia, CA) #28706
 6% TBE-Urea gels: Invitrogen (Carlsbad, CA) EC6865BOX
 4-16% NativePAGE Gel: Invitrogen (Carlsbad, CA)

Celulosa de oligo dT (concentración final: 100 mg/ml)

10 **[0210]** 2,5 g de celulosa de oligo dT se mezclaron con 25 ml de NaOH 0,1 N en un tubo de 50 ml. Después de girar la
 mezcla a 1500 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante resultante. El sedimento resultante que contenía
 la celulosa de oligo dT se lavó con 25 ml de tampón de unión a oligo dT 1X y luego se precipitó nuevamente girando
 a 1500 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante resultante se separó nuevamente del sedimento y se desechó. Este
 paso de lavado se repitió 3 veces más. Después del último tiempo de lavado, se midió el pH del sobrenadante
 15 resultante. El pH debe ser el mismo que el del tampón de lavado (~ pH 8,5). Luego, el sedimento que contenía la
 celulosa de oligo dT se separó del sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de tampón de unión a oligo dT 1X antes
 de almacenarlo a 4°C.

Preparación de agarosa M2

20 **[0211]** Se transfirió 25 ml de suspensión de agarosa M2 a un tubo de 50 ml. Después de girar durante 5 minutos a
 1000 RPM en una centrifuga Beckman, el sobrenadante se separó y se desechó. El sedimento resultante que contenía
 agarosa M2 se resuspendió con un volumen de columna de glicina 10 mM pH 3,5 y se hizo girar durante 5 minutos a
 1000 rpm. El sobrenadante resultante se descartó nuevamente. El sedimento de agarosa se resuspendió luego con
 25 un volumen de columna de tampón de unión de bandera 1X. La mezcla se hizo girar durante 5 minutos a 1000 RPM
 y el sobrenadante resultante se desechó. Esta etapa de lavado se repitió 3 veces y luego el sedimento se resuspendió
 con un volumen de columna de tampón de unión 1X (con 1 mg/ml de BSA y 100 µg/ml de ADNss). La mezcla se volcó
 durante 1 hora o durante la noche a 4°C antes de separarse en alícuotas en fracciones de 2 ml y almacenarse a 4°C.

Amplificación de la biblioteca de VH

30 **[0212]** A continuación se proporciona un método ejemplar para amplificar la biblioteca de VH:

Cebadores:

35 **[0213]**

5' Cebador: S7 (T7TMVUTR)
 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA-3' (SEQ ID No: 52)
 5' Cebador: S7a (T7TMVUTR AUG)
 40 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAATG-3' (SEQ ID No: 53)
 3' Cebador: XB-S5-1 (secuencia añadida Cµ2banderaA20 + visualización SA)

5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAT AGC GGA TGC TAA GGA CGA
 45 CTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTC GGTTGGGGCGGATGCACTCCC-3' (SEQ ID
 No:54)

Marco inverso 1 (traducción de la cadena de codificación complementaria al cebador):

50 I G S A S A P T D Y K D D D D K S S L A S A I (STOP) K K
 K K K K (SEQ ID No:55)

Configuración de reacción:

[0214]

60

65

ES 2 752 025 T3

| | | |
|---|--------------------------------------|-------|
| | Tampón de herculasa 10X (Stratogene) | 50 µL |
| | 10 mM dNTP | 10 µL |
| | S7 (5 µm) | 20 µL |
| 5 | S5-1 (5 µm) | 20 µL |
| | Biblioteca VH (1-6 familias) | 40 ng |
| | H2O | X µL |
| | Herculasa (Stratogene) | 10 µL |
| | 500 µl (50 µl/reacción) | |

10

Programa de ciclos de temperatura:

[0215]

15

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| | | 1 ciclo |
| 95C/3 minutos | | |
| 95C/30 segundos | } | |
| 50C/30 segundos | | 20 ciclos |
| 72C/1 minutos | | |
| 72C/10 minutos | | 1 ciclo |

20

[0216] Tm de 50C es aproximada y depende de una selección de cebadores PCR.

25

Purificación de la biblioteca:

[0217] Los ADN de la biblioteca de VH amplificados se separaron en gel de agarosa al 2%. La banda de 400 pb se cortó bajo luz UV para la extracción de ADN de la porción de gel utilizando Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen nº 28706, Valencia, CA) y la reconstitución en 300 µL H₂O. 5 µL de ADN purificado se aplicó para electroforesis en un 2% E-gel. Se esperaba que la tasa de recuperación fuera ~80%.

30

Transcripción

35

Configuración de la reacción (MEGAscript kit™, Ambion PH 1334, Foster City, CA)

[0218] Para la primera ronda de producción de la biblioteca, se recomienda una transcripción de ARN a escala completa (500 µl). El volumen de reacción puede reducirse en rondas posteriores.

40

| | |
|---------------------------|--------|
| | 200 µL |
| Producto de PCR (5-10 µg) | 200 µL |
| Tampón de reacción 10X | 50 µL |
| ATP (75 mM) | 50 µL |
| CTP (75 mM) | 50 µL |
| 45 | 50 µL |
| GTP (75 mM) | 50 µL |
| UTP (75 mM) | 50 µL |
| Polimerasa T7 | 50 µL |
| Total: | 500 µL |

50

Incubación

[0219] La mezcla de reacción como anteriormente se incubó a 37°C durante 1 - 2 horas o, preferiblemente, hasta toda la noche.

55

Purificación

[0220] Un método de purificación ejemplar es el fraccionamiento en una columna NAP-25, que se da a continuación. Las columnas NAP 10 y NAP 5 se pueden utilizar para la purificación de la producción a pequeña escala, en cuyo caso el volumen de la fracción se debe cambiar en consecuencia.

60

[0221] Para un proceso de purificación que usa una columna NAP-25, se pueden añadir 25 µl de Dasasa I a cada reacción de transcripción de 500 µl. La mezcla se incubará a 37°C durante 15 minutos antes de la extracción con fenol, cuando se agreguen 500 µl de fenol-cloroformo-isoamilalcohol a la mezcla. La mezcla se puede agitar en vórtex durante 30 segundos. Después de microfundir la mezcla durante 5 minutos, la fase acuosa se puede recuperar. Antes de cargar esta fase acuosa, una columna de NAP-25 se puede lavar previamente dejando que goteen 10 ml de dH₂O

65

a través de la columna. Luego, la mezcla de transcripción extraída puede cargarse en una columna lavada y pasar a la columna. Luego se pueden agregar 800 µL dH₂O a la columna y se puede recolectar el recorrido. Este proceso de elución se puede repetir cinco veces (E1-E5) y la concentración de ARN en la muestra recolectada se puede medir con A₂₆₀ en un espectrofotómetro. Se pueden aplicar 2 µL de muestra para electroforesis en un gel E al 2% a QC. La fracción que contiene más ARN puede usarse para la ligadura (E3 contiene poca cantidad, E4 es la fracción máxima, E5 contiene la mezcla de ARN y NTP libres).

[0222] Para calcular la concentración de ARN, 5 µl de cada elución se puede mezclar con 995 µl de H₂O antes de medir la OD de la mezcla.

$$\text{nmol de ARN} = \frac{\text{OD} \times 40 \times 800 \mu\text{l} \times 1000}{330 \times 400 \times 5 \mu\text{l}}$$

[0223] A continuación se ejemplifica un procedimiento de purificación de ARN alternativo (precipitación con LiCl): se pueden añadir 500 µL de LiCl 10 M a cada reacción de transcripción de 500 µl antes de congelar la mezcla verdadera a -20°C durante 30 minutos a 1 hora. La mezcla se puede aplicar para centrifugación a la velocidad máxima durante 20 minutos. El sobrenadante resultante se desechará, mientras que el sedimento se puede resuspender en 50 µl de NaOAc 3 M y 50 µL de dH₂O. Se puede realizar una precipitación estándar de EtOH. El sedimento resultante se puede disolver en 100 µL de dH₂O y luego se puede medir la concentración de ARN usando Qubit.

Fotoreticulación

[0224] Se usan dos tipos de enlazadores de psoraleno: un enlazador de ARN 2'O-Me PBI y un enlazador de ADN DDB-1 que contiene un resto de biotina para usarse en el ensamblaje de estreptavidina.

[0225] XB-PBI (SA/ADN enlazador de visualización OMe RNA/ADN):
5'-(Psoralen C6) u agc gga (Biotin-dT) gc uaa ggA CGA -3'

[0226] XB-DDB-1 (enlazador de visualización de ADN):
5'-(Psoralen C6) (C7-NH₂-EZ biotina) T AGC GGA TGC TAA GGA CGA -3'

[0227] Psoralen C6

u,a,g,c = 2-MeO-ARN

A,C,G = desoxi amiditas estándar

C7-NH₂ - espaciador amino 7

EZ-biotina, Pierce enlazador EZ TFP-espaciador-biotina

Marco inverso 1 (traducción de la región del enlazador como aparece en una cadena de codificación): S S L A S A

** El enlazador es sensible a la luz y debe protegerse de la luz con papel de aluminio, etc.)

[0228] En la configuración de la reacción, la relación de enlazador/ARN puede ser de 1,5:1 (máximo) a 1,1:1 (suficiente).

[0229] En la reacción de la Ronda 1, se sugiere una producción a gran escala (1-2 nmol de ARN) para cubrir suficiente diversidad. En rondas posteriores, la entrada de ARN puede reducirse a 100 - 600 pmol.

| | | |
|---------------------------------|-----|---------------------------|
| ARN | 1 | nmol |
| enlazador (1mM) | 1,1 | µL |
| tampón de ligadura química 10 X | 10 | µL |
| añadir dH ₂ O a | 100 | µL (10 pmol ARN/µL final) |

[0230] (La concentración final de ARN en la reacción de ligadura funciona de 3 a 15 pmol/ul. El volumen de reacción de ligadura puede variar.)

[0231] Para el recocido en un termociclador de PCR, la muestra puede incubarse a 85°C durante 30 segundos y hasta 4°C a una velocidad de 0,3°C/segundo.

[0232] Para la irradiación, se puede añadir 1 µL de DTT 100 mM a la mezcla de ligadura recocida. La mezcla se puede transferir a un tubo eppendorf de 0,5 ml de pared delgada o mantenerse en el mismo tubo de PCR. El proceso de irradiación se puede hacer con una lámpara UV portátil de longitud de onda múltiple (Uvp.com (Upland, CA) n° UVGL-25) en "onda larga" (365 nm) durante 6 minutos a temperatura ambiente. Se espera que aproximadamente 50-90% de ARN se ligue con el requisito de purificación.

[0233] Para el control de calidad de ARN ligado, se puede aplicar una muestra para electroforesis en un gel de TBU

al 6% para verificar la eficacia de la ligadura. Específicamente, el gel de 6% de TBU se puede preprocesar a menos de 300 V durante 15 minutos, seguido de la retirada del peine y enjuagar bien los pocillos. Luego, para cada pocillo, se pueden mezclar aproximadamente 10-15 pmol de ARN libre o ligado con un tampón de carga 2X (del kit de transcripción) y calentar juntos a 90°C durante 3 minutos, seguido de enfriamiento en hielo. El ARN libre y ligado precalentado se puede cargar en pocillos de gel precalentado para electroforesis a 300 V hasta que el tinte azul llegue al fondo.

[0234] Se llevó a cabo un experimento ejemplar como en la Figura 30. Específicamente, el ARNm de KDR se transcribió in vitro y se purificó de la reacción mediante precipitación con LiCl. Se recoció un equivalente del conector PBI a la muestra de ARNm calentando a 85°C seguido de enfriamiento lento a 4°C en 1x tampón X-link. Se añadió DTT a una concentración final de 1 mM. Las muestras se incubaron a una longitud de onda de 365 nm durante diferentes cantidades de tiempo y luego se resolvieron en un gel desnaturante de TBU al 6%. La imagen es una sombra UV del gel. Como se muestra en la Figura 30, la reticulación se observa después de 5 minutos de irradiación (Carril 7). Además, se usó una irradiación de 6 minutos para la fotoreticulación.

Carga de estreptavidina

[0235] La estreptavidina es una proteína tetramérica notablemente estable que se une a su biotina de ligando con una afinidad excepcionalmente alta, Kd de 10^{-15} M.

A. Con enlazadores PBI

[0236] Debido a la alta Tm de la porción de ARN de O-Me de conector PBI al ARN, se recomienda diluir el tampón de NaCl 100 mM original (como en el tampón de enlace X 1x) en sal 10-20 mM, que es una dilución 5-10x con agua. ½ a ¼ equivalente de solución de estreptavidina (Prozyme, San Leandro, CA) se puede agregar en PBS o 1x X-link buffer, por ejemplo, 1-2 µm de concentración final de estreptavidina para 4 µm de enlazador X ARN. Luego se puede agregar 1 µl de ARNsina y la mezcla se puede incubar a 48°C en un bloque de calor durante 1 hora.

B. Con enlazadores DDB

[0237] Dado que un enlazador DDB es una molécula todo de ADN, no se requiere dilución del tampón de enlazador X 1x (NaCl 100 mM). El enlazador DDB puede acomodar una mejor carga de SA, y es posible usar solo un exceso de 1,5-2x del ARNm reticulado para estreptavidina. ½ o 1:1,5 equivalente de solución de estreptavidina (Prozyme, San Leandro, CA) se puede agregar en PBS o tampón de enlazador X 1, por ejemplo, 2-2,5 µm de concentración final de estreptavidina para 4 µm de enlazador X ARN. Luego se puede agregar 1 µl de ARNsina y la mezcla se puede incubar a 48°C en un bloque de calor durante 1 hora.

[0238] En cada caso (A o B) puede esperarse que se cargue al menos más del 50% y hasta el 80% de estreptavidina.

Carga del enlazador de puomicina BPP

[0239] BPP: 5' Biotina-BB Cy3- (espaciador 18)4- CC Pu
BPP-8: 5' Biotina-BB Cy3- (espaciador 18)8- CC Pu
colorante Cy3

4 u 8 unidades del espaciador 18
Pu = Puomicina-CPG

[0240] Un enlazador BPP contiene puomicina, una molécula aceptora de péptidos en el extremo 3' (el aceptor de péptidos entra en el sitio A del ribosoma y se acopla covalentemente al extremo COOH de la cadena de polipéptidos nacientes). El conector tiene biotina en el extremo 5' que se une a la molécula de estreptavidina cargada en cada molécula de ARNm unido a X. Este aceptor de péptidos finalmente permitirá la estrecha asociación no covalente del ARNm (genotipo) a la proteína codificada por este ARNm (fenotipo). Cada versión de un enlazador BPP (con un espaciador-18 más corto 4x o con un espaciador-18 más largo 8x) contiene un resto de colorante fluorescente Cy-3 (Ex. 550, Em. 570 nm) para visualización. Otros colorantes fluorescentes se pueden utilizar en lugar de Cy-3, tales como fluoresceínas, BODIPY, Cy-5, rodaminas etc.

[0241] Específicamente, 1 equivalente de un enlazador BPP correspondiente (en relación a la cantidad de estreptavidina) se puede añadir a un conjunto de estreptavidina-ARNm cargado. La mezcla se puede incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Casi 100% del enlazador BPP a estreptavidina puede esperarse para la unión.

[0242] Se llevó a cabo un experimento ejemplar como en la Figura 31. Específicamente, el ARNm de KDR se transcribió in vitro y se purificó de la reacción mediante precipitación con LiCl. Se recoció un equivalente de enlazador PBI o DDB a la muestra de ARNm calentando a 85°C seguido de enfriamiento lento a 4°C en 1x tampón de enlace X, que contiene NaCl 100 mM. La muestra de ARNm unido a PBI-x se diluyó luego 5 veces hasta la concentración final de NaCl de 20 mM. La muestra de ARNm unido a DDB-x se usó sin diluir. Para la carga de estreptavidina, se añadió aproximadamente ½ equivalente de estreptavidina a cada muestra, seguido de 1 hora de incubación a temperatura

ambiente o a 50°C. Luego se añadió el enlazador BPP-Cy3 a cada muestra en cantidad, equivalente a estreptavidina. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, los conjuntos resultantes se resolvieron en una NativePage de 4-16%.

5 Paso opcional: purificación del conjunto SA en columna oligo dT

[0243] Dado que el ARNm contiene una cola de 20 As, se puede purificar en una columna oligo dT en este paso. Esta purificación no es absolutamente necesaria, pero puede mejorar algo el rendimiento de fusión en el siguiente paso.

10 Purificación del ensamblaje

[0244] Se puede agregar un volumen igual de tampón de unión de oligo dT 2X (Tris 200 mM, pH 8, NaCl 2 M, EDTA 20 mM, Tritón al 0,1%) al ensamblaje de ARNm-SA preparado. Luego, se puede agregar celulosa oligo-dT a la mezcla (100 mg de celulosa de oligo dT tratada/lavada (1 ml de suspensión) es suficiente para capturar hasta 1 nmol de entrada de ARN) antes de balancearse a 4°C durante 30-60 minutos. La mezcla se puede girar en una centrifuga de mesa a 1500 rpm durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se descartará. El sedimento resultante se puede resuspender en 700 µL de tampón de lavado oligo dT (Tris 100 mM pH 8, NaCl 1 M, No EDTA, 0,05% de Triton X-100), se cargó en una columna de goteo/centrifugado (BioRad # 732-6204, Hercules, CA) y luego se hizo girar en una microcentrifuga a 1000 rpm durante 10 segundos. La columna se puede lavar con 700 µL de tampón de lavado oligo dT y girar a 1000 rpm durante 10 segundos más. El paso de lavado puede repetirse 8 veces (durante cada lavado, las rpm de centrifugación y el tiempo pueden incrementarse si es difícil girar a través del tampón de lavado, pero no exceda de 1500 rpm). Se pueden recoger 5 µL del último lavado para contar. Luego, el conjunto de ARNm-SA se puede eluir con dH₂O. Se pueden usar 60 µL de dH₂O para E1, seguido de centrifugado a 1500 rpm durante 10 segundos (se usan 5 µL para el recuento). Para E2, se pueden agregar 500 µL de dH₂O a la columna. Después de la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se puede recoger E2 después de girar a 4000 rpm durante 20 segundos (se usan 5 µL para recuento). Para E3, se pueden agregar 300 µL de dH₂O e incubar con la columna durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se puede recoger E3 después de girar a 4000 rpm durante 20 segundos (se usan 5 µL para recuento). En este ejemplo, E2 contiene el 80% del conjunto ARNm-SA.

30 Traducción

[0245] El volumen de traducción se puede variar en función de la cantidad de entrada de ARN. A continuación se proporciona una condición ejemplar:

35 Configuración de traducción (300 µL)

[0246]

| | | |
|----|---|------------------------|
| | Ensamblaje ARN-SA 120 pmol + H ₂ O | 82 µL (o hasta 300 µL) |
| 40 | Mezcla maestra de aminoácidos (-met) | 15 µL |
| | Metionina 10 mM | 3 µL |
| | Lisado | 200 µL |
| | Volumen total | 300 µL |

45 **[0247]** La mezcla se puede incubar a 30°C en baño de agua o en una incubadora (en bloque de agua) durante 45 minutos a 1 hora.

Formación de fusión

50 **[0248]** 100 µL 2 M KCl (500 mM final) se pueden mezclar con 20 µL de 1M MgCl₂ (50 mM final) y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla resultante se puede congelar y almacenar opcionalmente a -20°C durante varios días. Además, la congelación mejora un poco el rendimiento de fusión.

55 **[0249]** Luego se pueden agregar 50 µL de 0,5 M EDTA a esta mezcla para desmontar los ribosomas y producir fusiones libres de ribosomas (10 µL guardados para QC).

[0250] Como una escala de traducción ejemplar para la selección, 1,2 nmol de ARN (10 x 300 µL) para la Ronda 1, 600 pmol de ARN (5 x 300 µL) para la Ronda 2 y 120 - 600 pmol de ARN (1-5 x 300 µL) para la Ronda 3 y más.

60 Purificación por fusión por celulosa de oligo dT: enlazador PBI

[0251] La purificación por oligo dT permite la purificación de moléculas de fusión de ARN (más ARN) y elimina las moléculas de proteínas libres generadas por traducción in vitro. Este procedimiento y el siguiente paso de transcripción inversa se deben usar cuando se traduce el ensamblador del vinculador PBI. En el caso del ensamblaje del enlazador DDB, se recomienda un procedimiento diferente.

Purificación por fusión

5 **[0252]** Se puede añadir un volumen igual de tampón de unión a oligo dT 2X (Tris 200 mM, pH 8, NaCl 2 M, EDTA 20 mM, Tritón al 0,1%) a la mezcla de traducción/fusión. La celulosa oligo-dT (100 mg de celulosa de oligo dT tratada/lavada (1 ml de suspensión) es suficiente para capturar la traducción/fusión de hasta 1 nmol de entrada de ARN) se puede agregar a la mezcla antes de oscilar a 4°C durante 30-60 minutos. Después de girar en una centrifuga de mesa a 1500 rpm durante 3 minutos a 4°C, se desechará el sobrenadante resultante. El sedimento resultante se puede volver a suspender en 700 µL de tampón de lavado oligo dT (Tris 100 mM pH 8, NaCl 1 M, sin EDTA, Triton x-100 al 0,05%) y cargarlo en una columna de goteo/centrifugado (BioRad nº 732-6204, Hercules, CA), seguido de centrifugado en una microcentrifuga a 1000 rpm durante 10 segundos. El sedimento resultante se puede resuspender en 700 µL de tampón de lavado oligo dT antes de girar a 1000 rpm durante 10 segundos para volver a precipitar el sedimento. Este paso de lavado puede repetirse 8 veces (durante cada lavado, las rpm de centrifugación y el tiempo pueden incrementarse si es difícil girar a través del tampón de lavado, pero no exceda las 1500 rpm). Se pueden recoger 5 µL del último lavado para recuento. Después del lavado, se puede usar dH₂O para la elución. Por ejemplo, se pueden usar 60 µL dH₂O para E1, seguido de centrifugado a 1500 rpm durante 10 segundos (se usan 5 µL para recuento). Para E2, se pueden agregar 500 µL de dH₂O a la columna. Después de la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se puede recoger E2 después de girar a 4000 rpm durante 20 segundos (se usan 5 µL para contar). Para E3, se pueden agregar 300 µL de dH₂O e incubar con la columna durante 5 minutos a temperatura ambiente. E3 entonces puede ser recogido después de girar a 4000 rpm durante 20 segundos (5 µL usado para recuento). En este ejemplo, E2 contiene el 80% del conjunto ARNm-SA.

Estimación de la producción de fusión:

25 **[0253]** La elución de las fusiones de la celulosa de oligo dT puede analizarse adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroforesis en gel, densitometría de fluorescencia o conteo de radiomarcadores, etc.

Transcripción inversa: enlazador PBI

30 **[0254]** El híbrido ARN-ADNc se hace para estabilizar y reducir la estructura secundaria del ARN y para servir como plantilla para la PCR después de la selección. En el caso del enlazador PBI, se prefiere la transcripción inversa de un cebador externo (S6), pero a una eficacia menor se puede hacer desde el enlazador PBI, ya que cuatro nucleótidos 3' del enlazador son ADN. Potencialmente, esto puede convertir el ensamblaje en fusiones con ADN, aunque usamos un enlazador diferente de ADN, DDB, para ese propósito.

Cebador externo de RT:

[0255]

40 XB-S6-1: 5'-TTAAAT AGC GGA TGC TAA GGA CGA CTTGTCGTCGTCGTCCTTG TAGTC
GGTTGGGGCGGATGCACTCCC-3' (SEQ ID No: 56)
Marco inverso 1: G S A S A P T D Y K D D D D K S S L A S A I (STOP) (SEQ ID No:57)

Configuración de la reacción: (Kit de transcripción inversa Invitrogen)

[0256] Las eluciones de oligo-dT se pueden girar a 10000 rpm durante 30 segundos para eliminar la celulosa residual.

| | | |
|----|--|-------------------------------|
| 50 | Sobrenadante E2 + E3 del centrifugado: (10-20 µL E2 recogidos para electroforesis en gel) | 800 µL (<1000 pmol en total) |
| | Cebador RT (S6-1) 1 mM | 1 µL (1000 pmol) |
| | 5 x tampón de primera hebra | 220 µL |
| | 0,1 M DTT | 11 µL (1 mM final) |
| 55 | 25 mM dNTP | 22 µL (0,5 mM final cada uno) |
| | Superscript II | 25 µL |
| | H ₂ O | 21 µL |
| | <hr/> Total | <hr/> 1100 µL |

60 Incubar a 37°C durante 45-60 min (eliminar 10 µL para correr en gel).

[0257] QC: la síntesis de ADNc puede monitorizarse mediante electroforesis en gel usando NativePage y detectarse mediante fluorescencia del colorante Cy-3.

65 Purificación de fusión por celulosa de oligo dT, junto con la transcripción inversa y digestión de RNasaH: enlazador DDB

[0258] Al realizar la purificación y transcripción inversa Oligo dT en la columna en el ensamblaje de ARNm-SA con el enlazador DDB, generamos fusiones visualizadas con ADN. DDB en este caso sirve como un cebador RT. El mismo procedimiento podría aplicarse al enlazador PBI, que también está diseñado para servir como un cebador interno de RT, pero demostró una menor eficiencia en comparación con DDB.

[0259] Fusiones de visualización de ADN demuestran una gran estabilidad a digestión de nucleasa y se utilizan para selecciones basadas en células e *in vivo*.

Inmovilización por fusión en la celulosa de oligo dT

[0260] El volumen igual de tampón de unión de oligo dT 2X (Tris 200 mM, pH 8, NaCl 2 M, EDTA 20 mM, Tritón al 0,1%) se puede agregar a la mezcla de traducción/fusión. La celulosa oligo-dT (100 mg de celulosa de oligo dT tratada/lavada (1 ml de suspensión) es suficiente para capturar la traducción/fusión de hasta 1 nmol de entrada de ARN) se puede agregar luego antes de balancear a 4°C durante 30-60 minutos. Después de girar en una centrifuga de mesa a 1500 rpm durante 3 minutos a 4°C, se desechará el sobrenadante resultante. El sedimento resultante se puede volver a suspender en 700 µL de tampón de lavado oligo dT (Tris 100 mM pH 8, NaCl 1 M, sin EDTA, Triton x-100 al 0,05%) y cargarlo en una columna de goteo/centrifugado (BioRad nº 732-6204, Hercules, CA), seguido de centrifugado en una microcentrífuga a 1000 rpm durante 10 segundos. La columna se lava con 700 µl de tampón de lavado oligo dT, seguido de centrifugado a 1000 rpm durante 10 segundos. El sedimento resultante se puede lavar repetidamente 8 veces (durante cada lavado, las rpm de centrifugación y el tiempo se pueden aumentar si es difícil girar a través del tampón de lavado, pero no exceda las 1500 rpm). Se recogerán 5 µL del último lavado para recuento.

Transcripción inversa en la celulosa de oligo dT

[0261] La resina oligo dT con fusiones inmovilizadas se puede equilibrar en 1x tampón de primera cadena (preparar por separado). El tampón contiene KCl 75 mM y MgCl₂ 3 mM, lo que evita la elución de las fusiones de la resina.

[0262] Se puede preparar una mezcla para la transcripción inversa como sigue y luego incubarse a 37-39°C durante 60-75 minutos.

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Agua | 695 µl |
| 5 x tampón de primera hebra | 200 µl |
| 0,1 M DTT | 10 µl (1 mM final) |
| 25 mM dNTPs | 40 µl (1 mM final cada uno) |
| Superscript II | 50 µl |
| RNasin | 5 µl |
| <hr/> | <hr/> |
| Total | 1000 µl |

(En este ejemplo no hay cebador RT externa agregado. Hay una mayor cantidad de dNTPs y SSII transcriptasa inversa.)

[0263] En este paso la hebra de ADNc se construye que está unida covalentemente al resto de biotina y a su vez fuertemente no covalentemente unido al sandwich de fusión de estreptavidina-BPP, formando así un precursor de las fusiones exhibidas por el ADN.

Digesto de ARNasa H de la cadena de ARN y elución de la celulosa oligo dT.

[0264] Después del paso de transcripción inversa, a la misma columna se puede agregar una cantidad correspondiente de ARNasa H (10 µL de ARNasa H (2 U/µL, Invitrogen, Carlsbad, CA)) para una reacción de 1000 µL descrita anteriormente). Incubar durante 1 hora adicional a 37°C.

[0265] Las fusiones de ADN de cadena sencilla se pueden eluir haciendo girar hacia abajo la columna de oligo dT a 2000 rpm durante 1 minuto y luego lavarse con 500 µL de 1x tampón de primera cadena. En este ejemplo, alrededor del 80-95% del material puede eluirse de la columna.

[0266] Se llevaron a cabo experimentos ejemplares como en las Figuras 32 y 33. Como se muestra en la Figura 32, el ensamblaje de visualización de ADN (ARNm-xligado con el enlazador DDB) se tradujo en RRL durante 1 hora a 30°C a una concentración de ARNm de 200 nM. El producto se cargó en una columna oligo-dT (Carril 2-3). La columna se lavó varias veces con 1x tampón oligo-dT y luego dos veces con 1x tampón RT, seguido de la adición de dNTP y SSII RT durante 1 hora a 37°C. El tratamiento con RNasaH se llevó a cabo durante otra hora más a 37°C. La columna se eluyó girando hacia abajo (filtro de rotación). En los carriles 4 y 5, los ensamblajes de ARNm con enlazador PBI se tradujeron de manera similar a lo anterior, seguido de tratamiento con resina oligo dT y elución con Tris 5 mM, pH 7,0.

[0267] En la Figura 33, el ensamblaje de visualización de ADN (ARNm-xligado con el enlazador DDB, carriles 1, 2 y 3, o enlazador BPP, los carriles 4 y 5 (enlazador BPP-8)) se tradujo en RRL durante 1 hora a 30°C a una concentración de ARNm de 200 nM. El producto se cargó en una columna oligo-dT. La columna se lavó varias veces con 1x tampón oligo-dT y luego 2x con 1x tampón RT, seguido de la adición de dNTP y SSII RT durante 1 hora a 37°C. El tratamiento con RNasaH se llevó a cabo durante otra hora más a 37°C. La columna se eluyó girando hacia abajo (filtro de rotación). Las fusiones se purificaron luego en una agarosa anti Flag M2 (carriles 2, 3 y 5).

2ª síntesis de la cadena y la terminación del conjunto de fusión de visualización ADN.

[0268]

XB_S7 (T7TMVUTR2 42-mer; cebador 5' PCR para ambas VH IgM, bibliotecas IgG): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA-3' (SEQ ID No: 52) XB_S7a (cebador T7TMV 45 mer con ATG adicional, mejora Tm por 3' C): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAATG-3' (SEQ ID No: 58).

[0269] A la elución del paso anterior, se pueden agregar dNTPs adicionales y SSII RT, junto con 1-1,5 equivalente del cebador TMV-T7 S7 o S7a.

[0270] Una reacción a modo de ejemplo incluye mezclar reactivos adicionales por reacción de 1500 µl, como se describe anteriormente:

| | |
|----------|-------------------|
| S7 o S7a | 1-1,5 equivalente |
| SSII RT | 10 µL |
| dNTP | 10 µL |

[0271] La mezcla puede incubarse durante 1 hora adicional a 37-39°C. Después de la síntesis de la segunda cadena, el ensamblaje de fusión que se muestra en el ADN se completa y después de una purificación adicional en una resina de anticuerpo anti FLAG, las fusiones se pueden usar para selecciones basadas en células o *in vivo*.

[0272] Un experimento ejemplar se muestra como en el montaje de la Figura 34. El ARNm se llevó a cabo de la siguiente manera: 4 µm ARN y 4 µm enlazador (DDB o PBI) se hibridaron 85 y 4°C en tampón de enlazador X 1x; luego se añadió DTT a 1 mM y UV 365 durante 6 min. Luego, se cargó SA como relación 1: 2 (ARNm final a 2 µm y SA a 1 µm) en 0,67x tampón de enlazador X a 48°C durante 1 hora. Se añadió un conector de Puomicina Cy3 (BPP - 4 xC18 espaciador) a 1 µm al conjunto durante 10 minutos a temperatura ambiente (temperatura ambiente). No se realizó la purificación de oligo dT. La siguiente reacción de RT se llevó a cabo de la siguiente manera: RT estándar usando superíndice II (SSII) a 42°C usando 3 condiciones: DDB como cebador de RT, PBI como cebador de RT y S6 (cebador externo) solo en el ensamblaje de PBI.

[0273] Cada una de las reacciones de RT se trató con RNasa H (2 U) durante 1 hora a 37°C. Además, la segunda cadena se sintetizó agregando el cebador Y7 (T7-TMV) 1: 1 y enzima SSII RT extra y se extrajeron dNTP durante 1 hora a 42°C (condiciones tomadas de Kurtz, Chembiochem 2001).

Purificación de etiqueta de FLAG

[0274] La purificación de bandera recupera solo moléculas de proteína de longitud completa y elimina cualquier ARN libre y moléculas de proteína truncadas generadas por traducción *in vitro*.

Enlace y lavado:

[0275] 500 µL de suspensión de agarosa M2 (10 mM Gly pH 3,5 pre-pelada y bloqueada previamente en tampón de unión 1 x) puede ser transferida a un tubo de 2 ml. Después de girar en una microcentrífuga a 1500 rpm durante 1 minuto, se descartará el sobrenadante resultante. La agarosa se puede lavar más dos veces con 1 ml de tampón de unión de marcador. La agarosa M2 lavada puede mezclarse con una biblioteca químicamente modificada preparada (se usan 5 ml para el recuento) y 1/4 de volumen de la biblioteca de tampón de unión de bandera 5X y se balancea a 4°C durante 1 hora a toda la noche. Después de girar en una microcentrífuga a 1500 rpm durante 1 minuto, el sobrenadante resultante se transferirá a un tubo nuevo, mientras que el sedimento de agarosa M2 resultante se resuspenderá en 0,7 ml de tampón de unión de bandera y se cargará en una columna de goteo. La columna cargada se puede hacer girar en una microcentrífuga a 1000 rpm durante 10 segundos y luego se lava 6 veces con 0,7 ml de tampón de unión de bandera, seguido de un giro a 1000 rpm durante 10 segundos. Luego, la columna se puede lavar dos veces con 0,7 ml de tampón de unión 1x, seguido de centrifugado a 1000 rpm durante 10 segundos. (Se pueden recoger 5 µL del último lavado para contar).

Elución:

[0276] 500 µL de 100 µg/ml de péptido FLAG en tampón de unión 1X se puede añadir a la columna. Después de incubarse durante 5 minutos, la columna puede girar a 3000 rpm antes de recoger la elución. El proceso de elución se puede repetir con 300 µl de péptido indicador (se pueden recoger 5 µl de cada elución para recuento).

5 Estimación de la recuperación:

[0277] Rutinariamente, la tasa de recuperación puede ser de alrededor del 10-30%. La recuperación se puede medir por fluorescencia u otros métodos conocidos en la técnica.

10 PCR

[0278] Dependiendo del propósito, se puede usar polimerasa Taq o polimerasa de alta fidelidad para la amplificación. Se recomienda una PCR a pequeña escala para verificar los ciclos de PCR para prevenir los artefactos de PCR generalmente causados por una amplificación excesiva.

15 Configuración de la reacción:

[0279]

| | | |
|----|--------------------------------------|---------------|
| 20 | 10X tampón de herculasa (Stratagene) | 2,5 µL |
| | 10 mM dNTP | 0,5 µL |
| | T7 TMV UTR (5 µm) | 1 µL |
| | Cµ2banderaA20 (5 µm) | 1 µL |
| 25 | Plantilla | 2,5 µL |
| | H ₂ O | 17 µL |
| | <u>Herculasa (Stratagene)</u> | <u>0,5 µL</u> |
| | | 25 µL |

30 Nota: Las fracciones recogidas en los pasos anteriores, por ejemplo, flujo, último lavado, Elución 1 y Elución 2, pueden usarse como plantilla para PCR. Específicamente, se pueden usar 2,5-5 µL de plantilla en esta reacción de PCR, especialmente para rondas de selección temprana (ronda 1-3, por ejemplo). Sin embargo, puede ser útil usar menos. A continuación se enumera una condición de PCR ejemplar:

| | | | |
|----|--------------------------|---------|--|
| 35 | 95°C durante 3 minutos | 1 ciclo | |
| | 95°C durante 30 segundos | } | X ciclos (X = 15, 20 o 25 dependiendo de la señal) |
| 40 | 50°C durante 30 segundos | | |
| | 72°C durante 1 minuto | | |
| 45 | 72°C durante 5 minutos | 1 ciclo | |

Nota sobre Tm: Tm se calcula para el cebador. En este ejemplo, los cebadores pueden tener Tm superiores a 50°C o de 52 a 65°C.

50 **[0280]** Después de la reacción de PCR, se pueden usar 5 µl de mezcla de reacción para electroforesis en un gel E al 2%. Una banda principal que tiene un tamaño de ~ 400 pb se puede esperar en el gel. Si la calidad de la PCR a pequeña escala es aceptable, el resto de la elución puede usarse como plantilla para la PCR a gran escala en condiciones similares.

55 Purificación de ADN:

[0281] A veces puede ser necesario purificar el producto de PCR. Después de la electroforesis, la rodaja de gel en gel de agarosa al 2% que contiene el producto de PCR (la banda de 400 pb) se puede cortar bajo luz UV. Luego se puede extraer el ADN de la rodaja de gel usando el kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen nº 28706, Valencia, CA). Se pueden usar 5 µl de ADN purificado para electroforesis en un gel E al 2%. Por lo general, ~ 80% de recuperación se puede esperar.

60 Etiquetado para secuenciación 454: visualización de ADN

65 **[0282]** Para el etiquetado de moléculas individuales en el paso de selección sin amplificación se utiliza el siguiente cebador de 2ª cadena: GCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNGGACAATTACTATTTACAATTACA ATG (SEQ ID No: 59).

[0283] Este cebador contiene secuencia TMV, una secuencia adaptadora 454 y etiqueta aleatoria N6. El cebador de PCR correspondiente para el extremo 3' (contiene un segundo adaptador 454, Tm de la parte específica del gen es 50,4 C)

5 GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAGCGGATGCTAAGCACGA (SEQ ID No: 60)

[0284] La preparación del amplicón se realiza usando cebadores adaptadores únicamente:

Delantero: Tm 64,7°C

10 GCCTCCCTCGCGCCATCAG (SEQ ID No: 61)

Inverso: Tm 65,7°C

GCCTTGCCAGCCCGCTCAG (SEQ ID No: 62)

[0285] Tm de ambos son alrededor de 65°C, por lo que es posible el tipo RACE de PCR para un cebador de 3'.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de visualización X que comprende:

- 5 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido, en la que la molécula de ácido nucleico está unida covalentemente a un primer ligando de alta afinidad;
 (b) un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico; y
 (c) un receptor de ligando unido a un receptor de péptido, en el que el receptor de péptido está unido covalentemente al extremo C del polipéptido,

10 y en el que el primer ligando de alta afinidad está unido al receptor de ligando, y el polipéptido está unido no covalentemente a la molécula de ácido nucleico.

2. El complejo de la reivindicación 1, en el que el aceptor de ligando está unido covalentemente al aceptor de péptido.

15 3. El complejo de la reivindicación 1, que comprende además un segundo ligando de alta afinidad, en el que el segundo ligando de alta afinidad está unido covalentemente al receptor peptídico, y en el que el segundo ligando de alta afinidad está unido al aceptor de ligando.

20 4. Una biblioteca de complejos de visualización X que comprende una pluralidad de los complejos de las reivindicaciones 1 o 3, en la que al menos una porción de los complejos contiene diferentes secuencias codificantes de polipéptidos.

25 5. Un método para seleccionar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido capaz de unirse a un antígeno de interés, que comprende los pasos de:

- (a) proporcionar la biblioteca de complejos de visualización X de la reivindicación 4;
 (b) poner en contacto la biblioteca con un antígeno de interés;
 (c) seleccionar de la biblioteca al menos un complejo de visualización X que se une al antígeno de interés; y,
 (d) aislar la secuencia que codifica el polipéptido del complejo de visualización X seleccionado.

35 6. El complejo, biblioteca o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer ligando de alta afinidad y el segundo ligando de alta afinidad son idénticos o en donde el primer ligando de alta afinidad o el segundo ligando de alta afinidad se selecciona del grupo que consiste en FK506, metotrexato, PPI-2458, biotina, hirudina, ZFVp(O)F, fluoresceína-biotina, ABD (dominio de unión a albúmina), ADN de 18 pb, ARNasa A, cloroalcanos, aril (beta-amino etil) cetonas y proteína A.

40 7. El complejo, biblioteca o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos uno de los ligandos de alta afinidad primero y segundo es biotina.

45 8. El complejo, biblioteca o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el aceptor de ligando se selecciona del grupo que consiste en FKBP12, dihidrofolato reductasa, metionina aminopeptidasa, estreptavidina dimérica, estreptavidina, trombina, carboxipeptidasa, monovalente Ab, HSA (albúmina), Dedo Zn, hRI (inhibidor de RNasa), haloalogenasa de haloalcano mutada, haloTag y sortasa.

50 9. El complejo, biblioteca o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un dominio VH, un dominio VL, un fragmento Fab, un anticuerpo de cadena única, un nanocuerpo, un unibody, un receptor de células T (TCR), una adnectina, un aficuerpo, un DARPin, un anticulina, un avímero, un dominio Fn3 y un versacuerpo.

55 10. El complejo, biblioteca o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aceptor de péptido se selecciona del grupo que consiste en puromicina, pirazolopirimidina, fenilalanil-adenosina, tirosil adenosina, alanil adenosina, fenilalanil 3' desoxi 3' amino adenosina, alanil 3' desoxi 3' amino adenosina y tirosil 3' desoxi 3' amino adenosina.

60 11. El complejo, biblioteca o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ARNss, ADNss, ADNss/ARN híbrido, ADNds y ADNds/ARN híbrido.

65 12. El complejo, biblioteca o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia que codifica el polipéptido de la molécula de ácido nucleico no contiene un codón de parada en el marco.

13. El complejo, biblioteca o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el complejo no contiene un ribosoma.

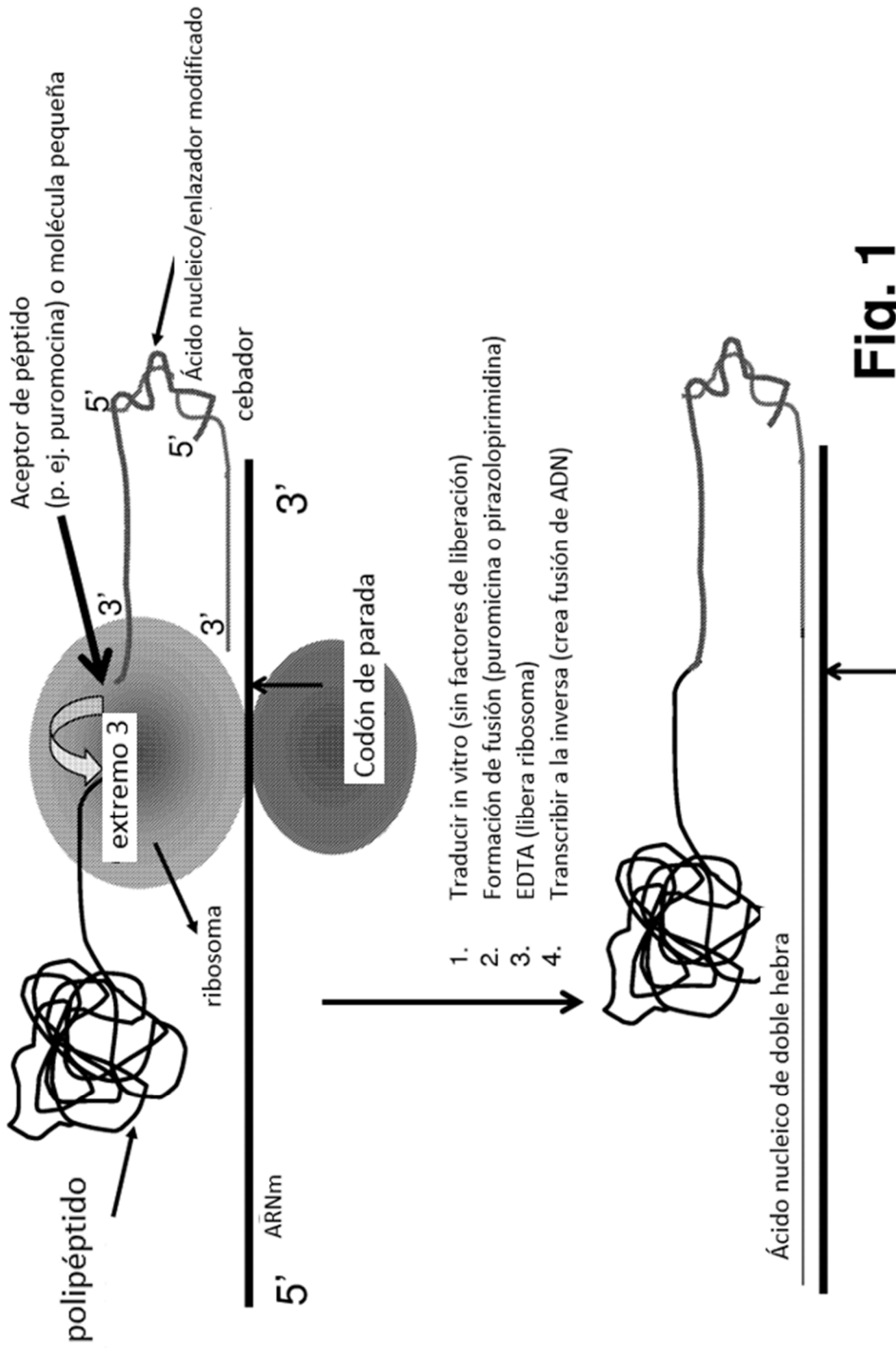


Fig. 1

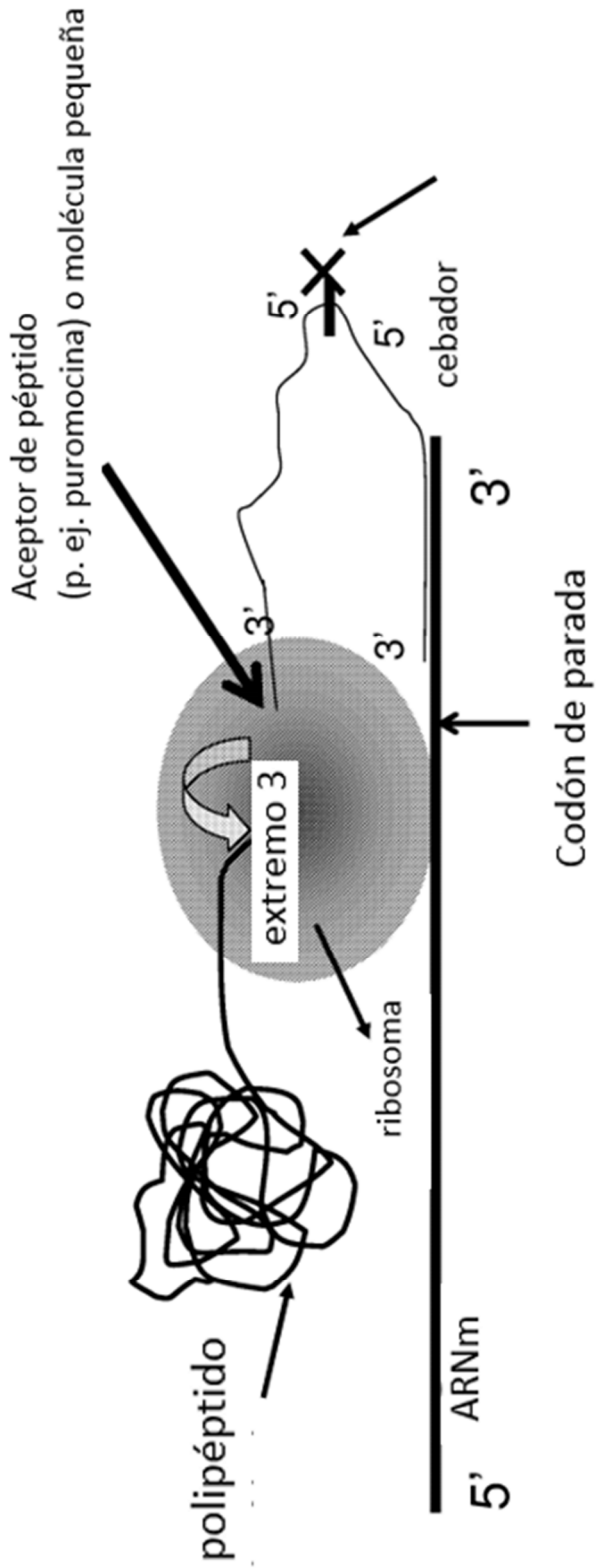


Fig. 2

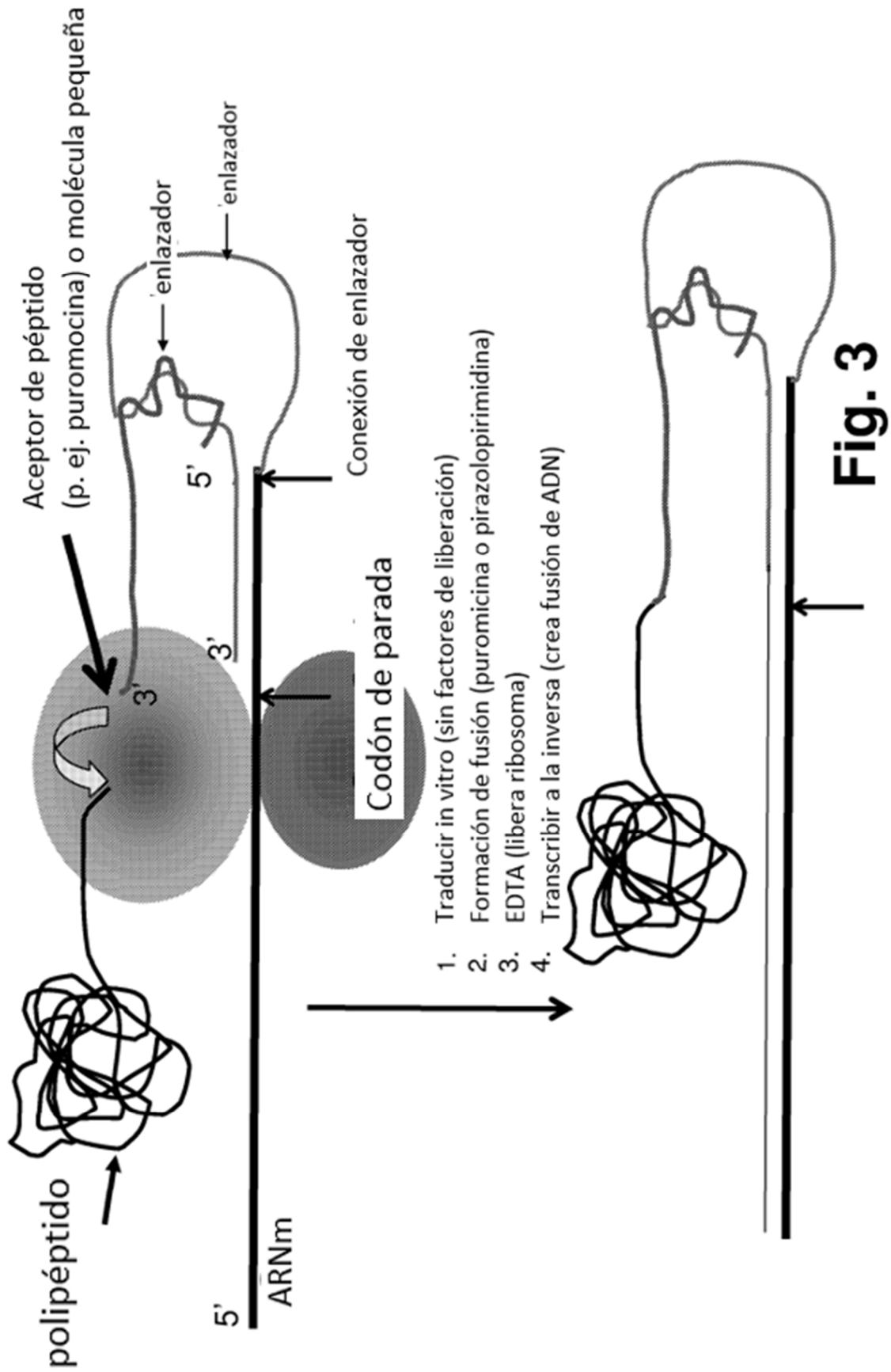


Fig. 3

Visualización de ARNm de ligando/aceptor

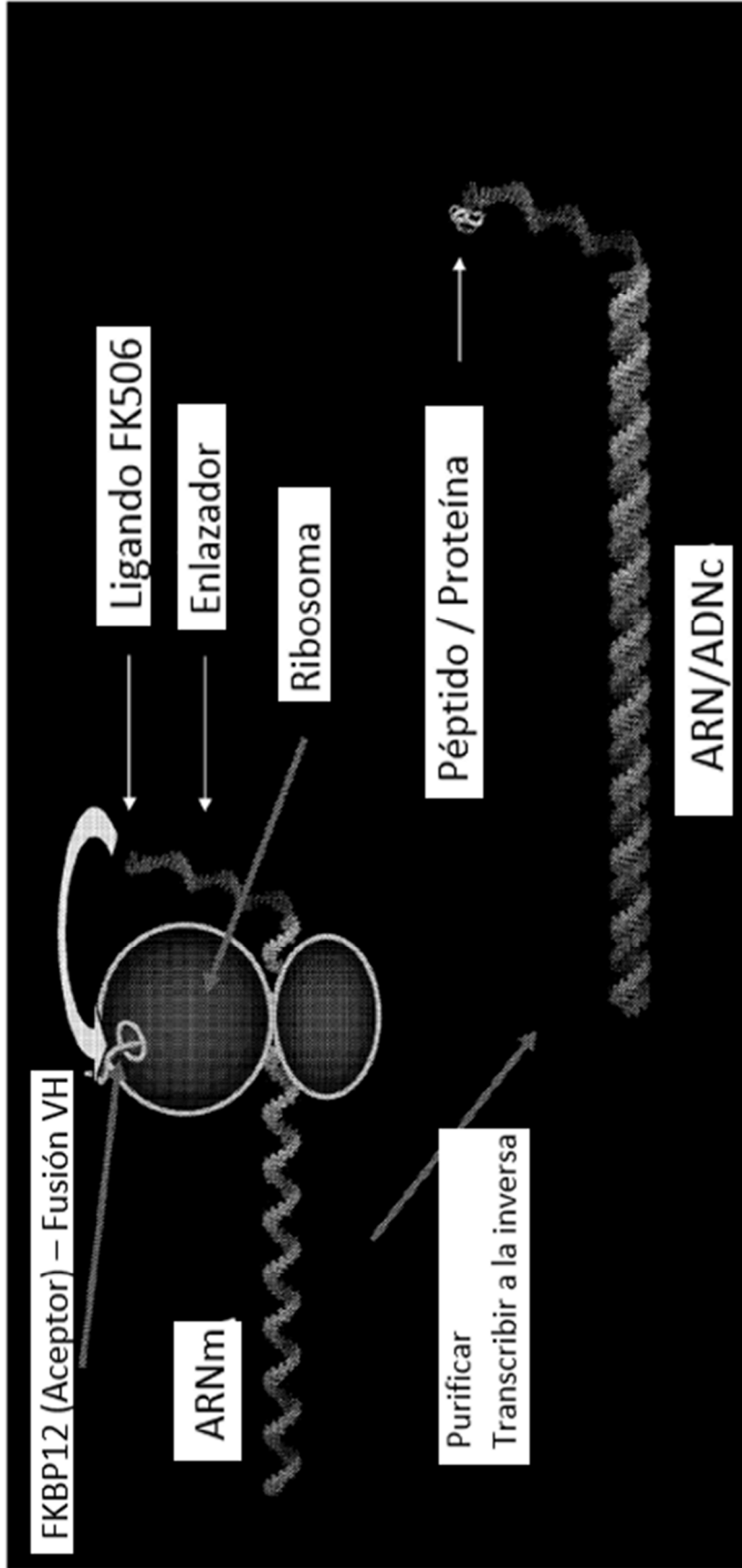


Fig. 4

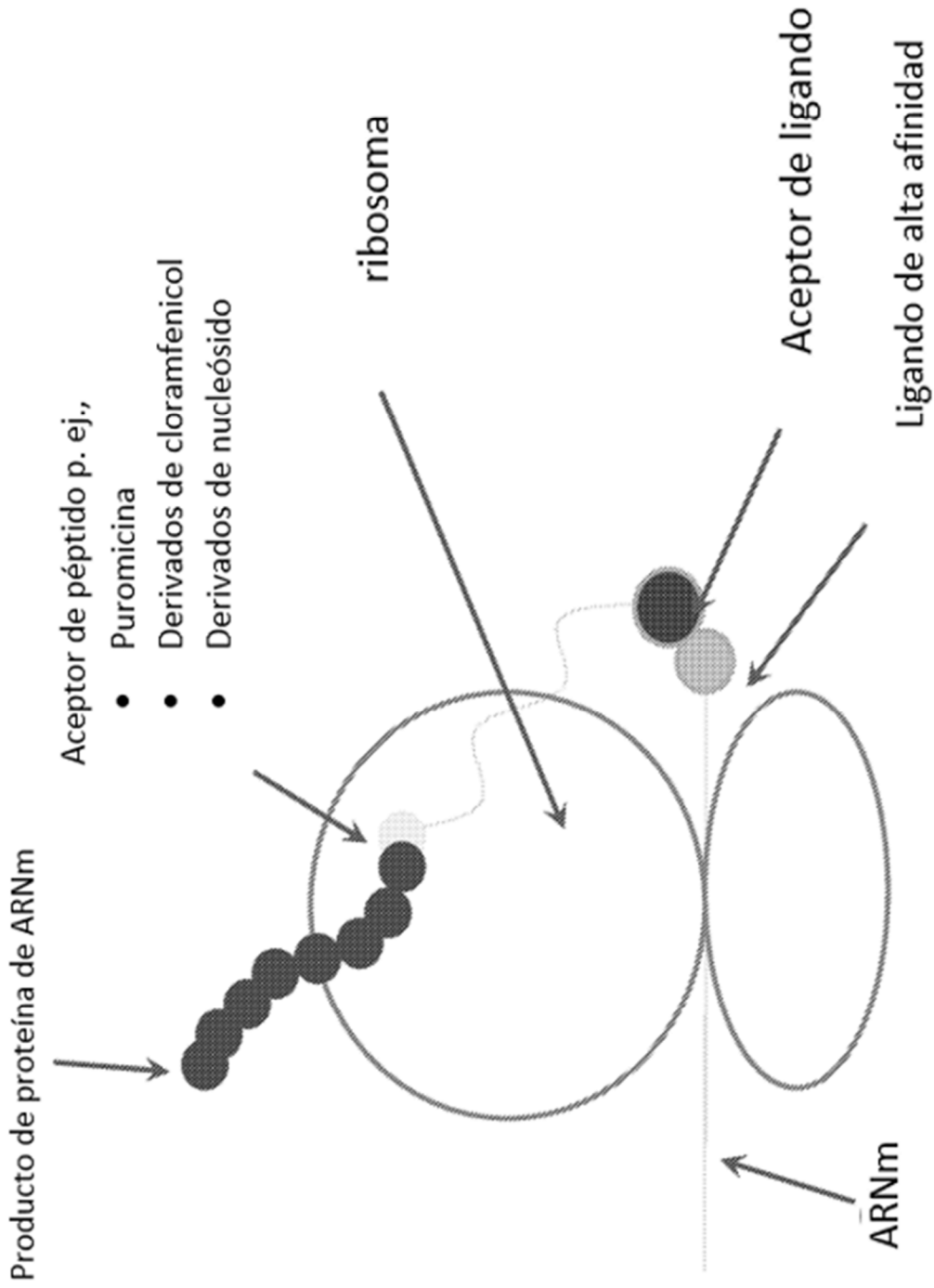


Fig. 7

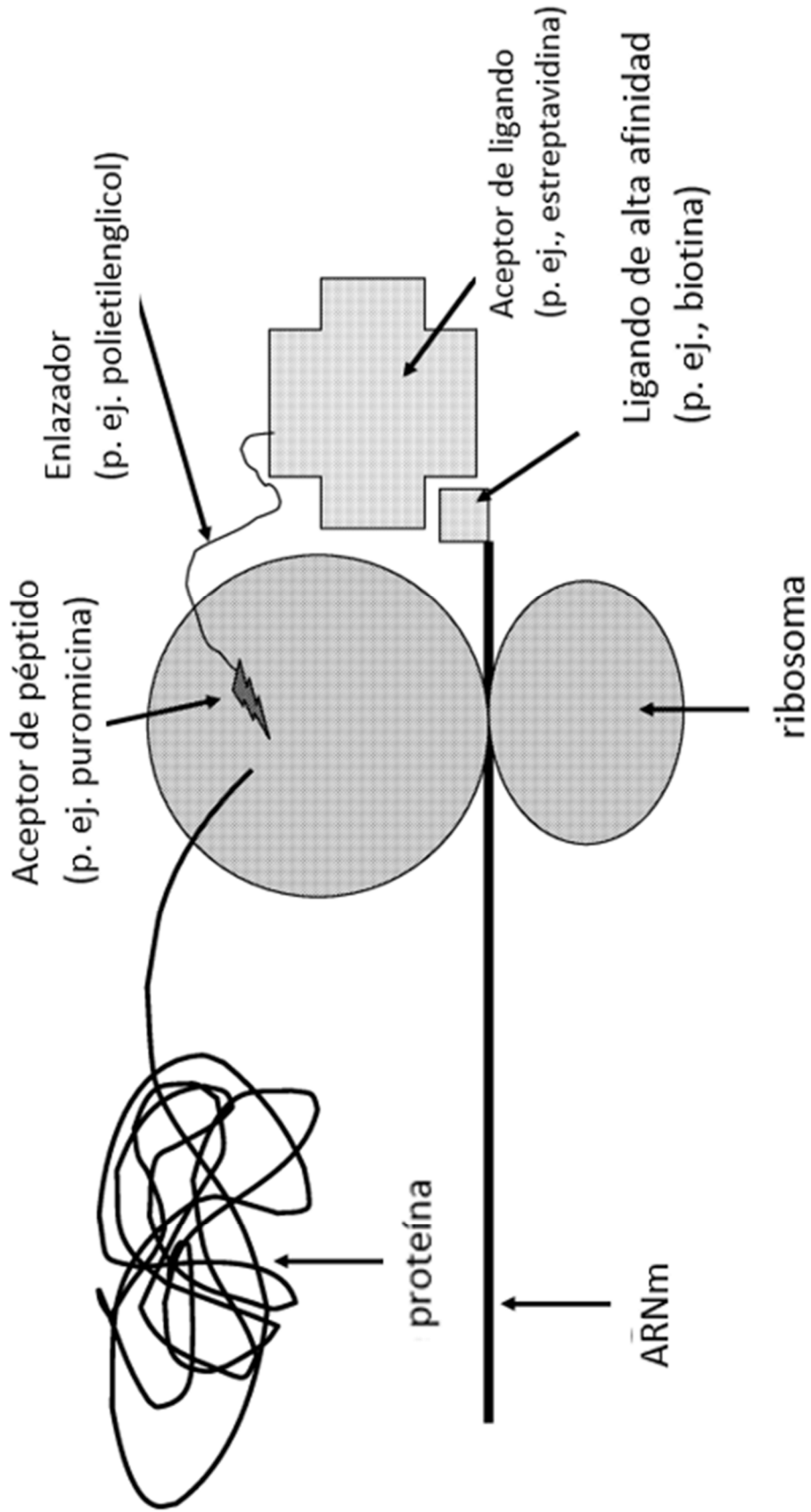
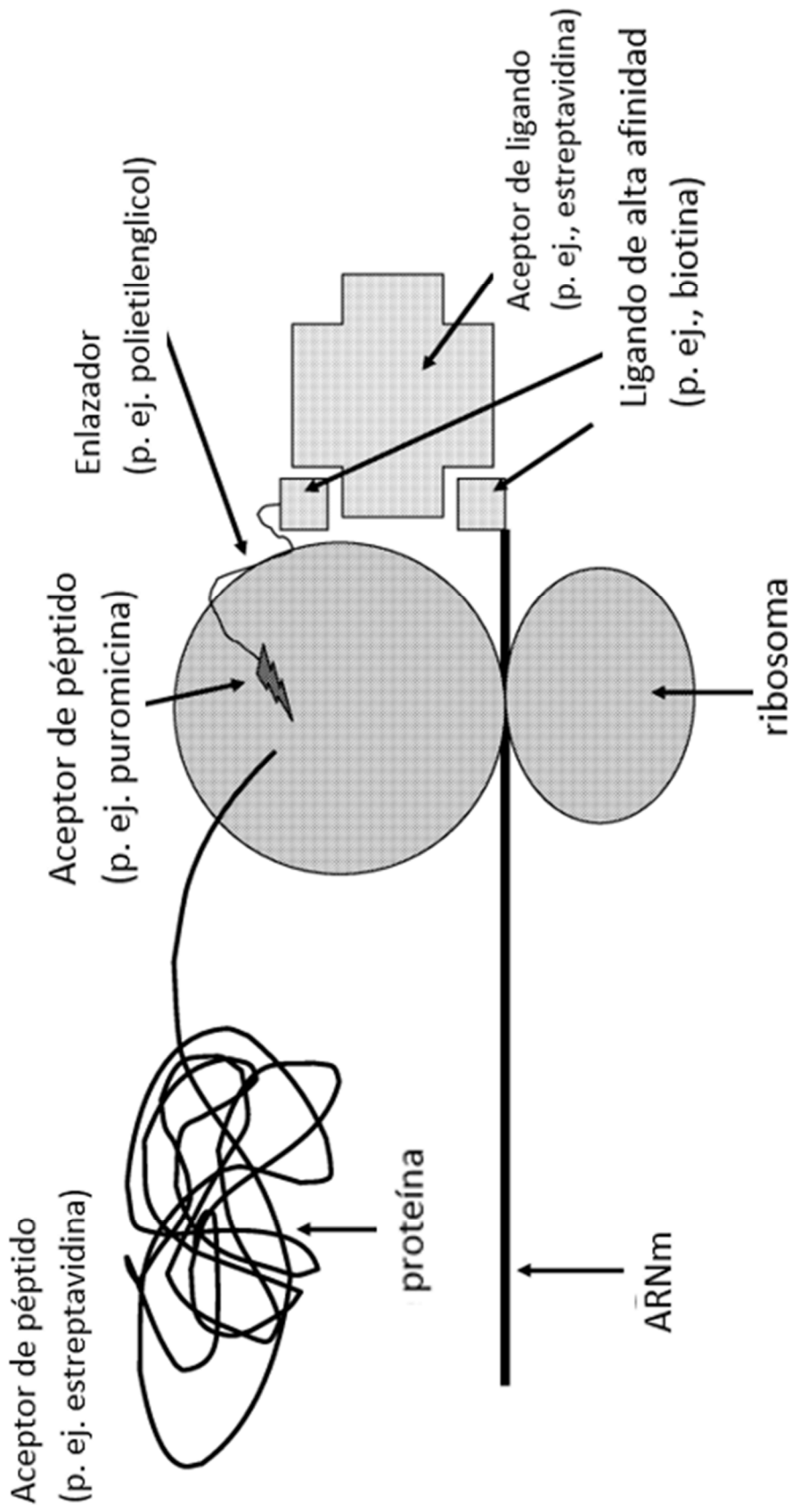


Fig. 8



Aceptor es multimérico. Ligando-ARN enlaza un sitio. Enlazador de ligando enlaza a un segundo sitio en aceptor. El aceptor para ribosoma

Fig. 9

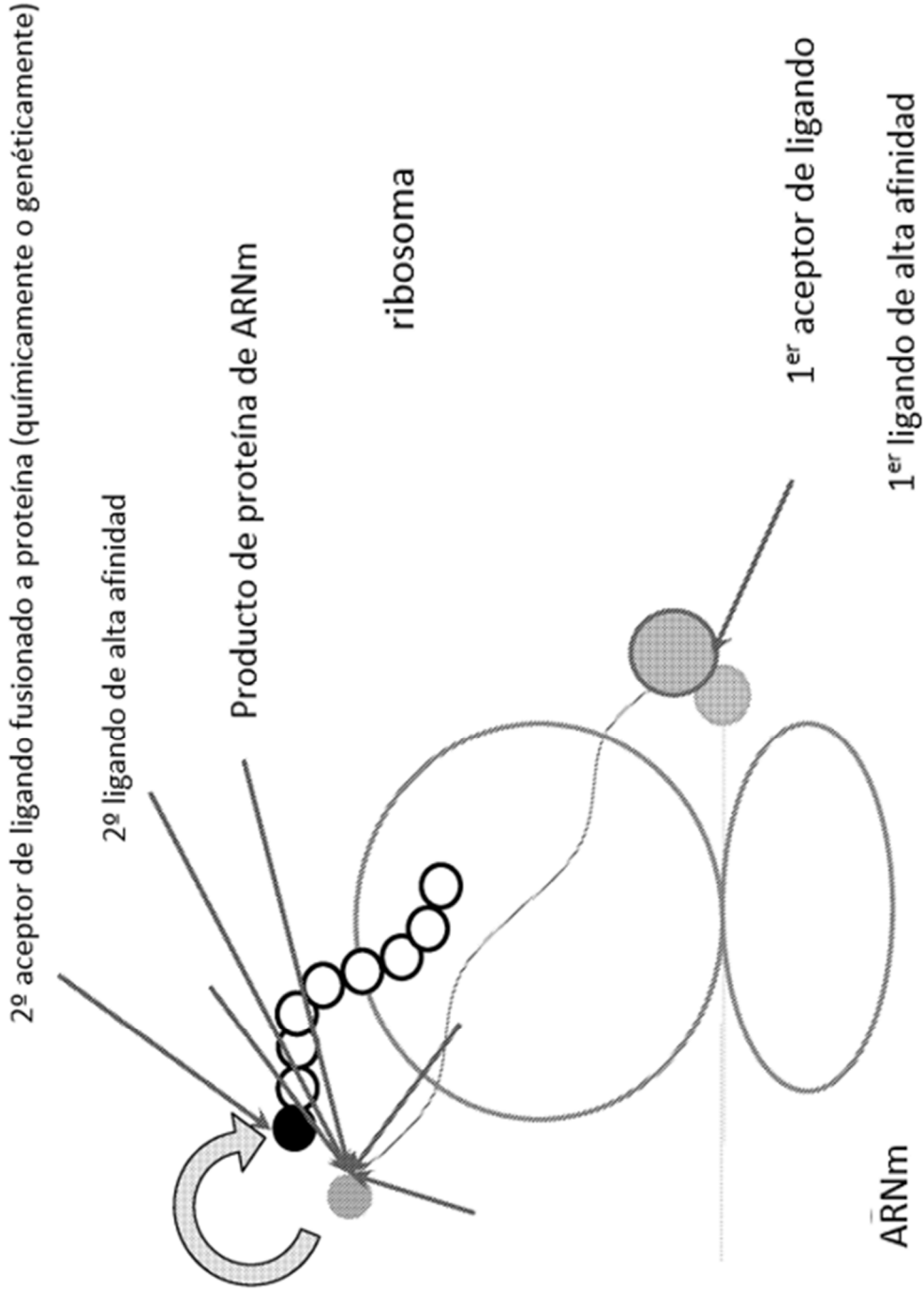


Fig. 10

Ejemplo de componentes de visualización de ARN no covalente

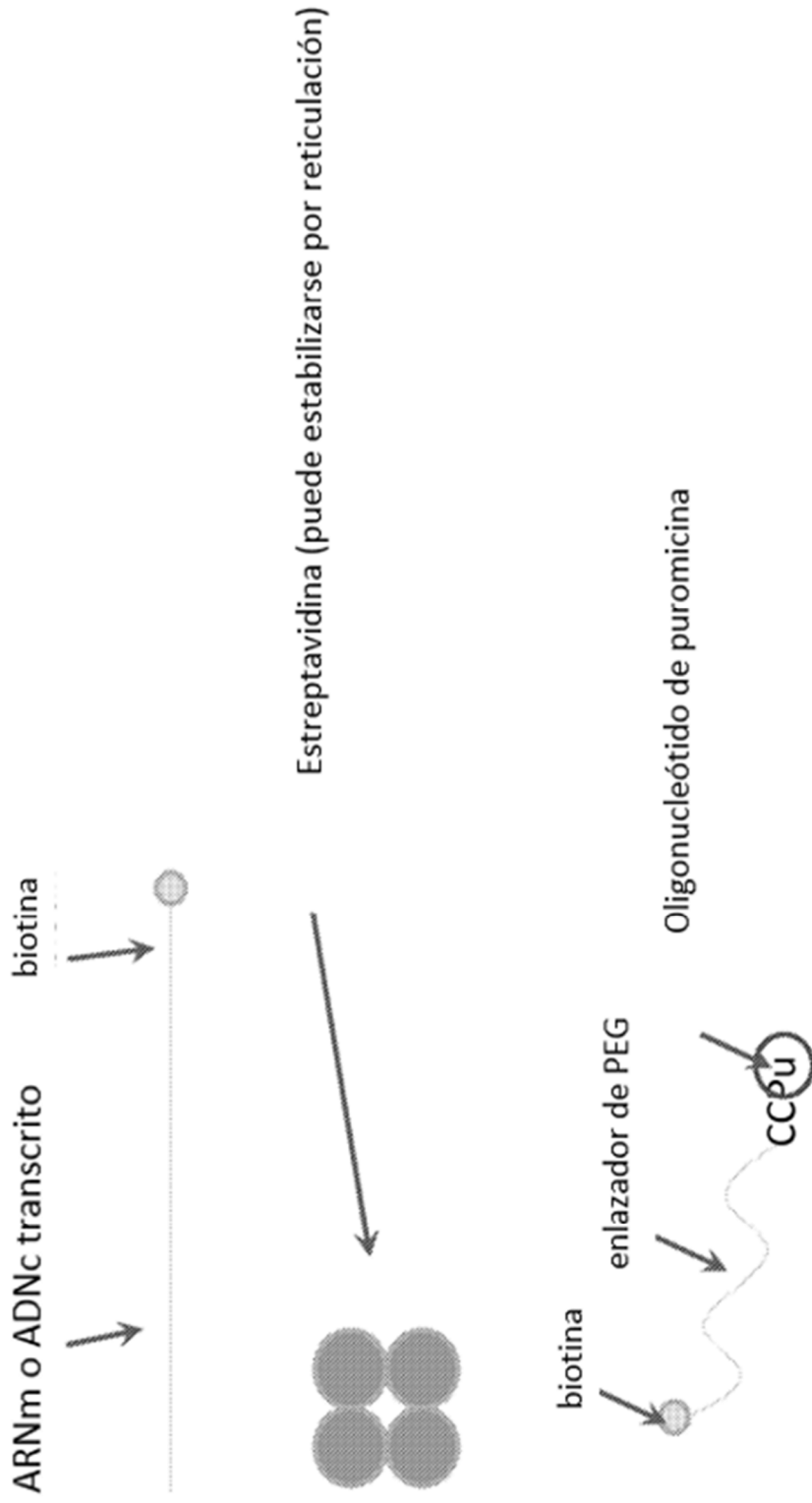


Fig. 11

Ejemplo de orden de conjunto de visualización de ARN no covalente utilizando

oligonucleótido de puromicina

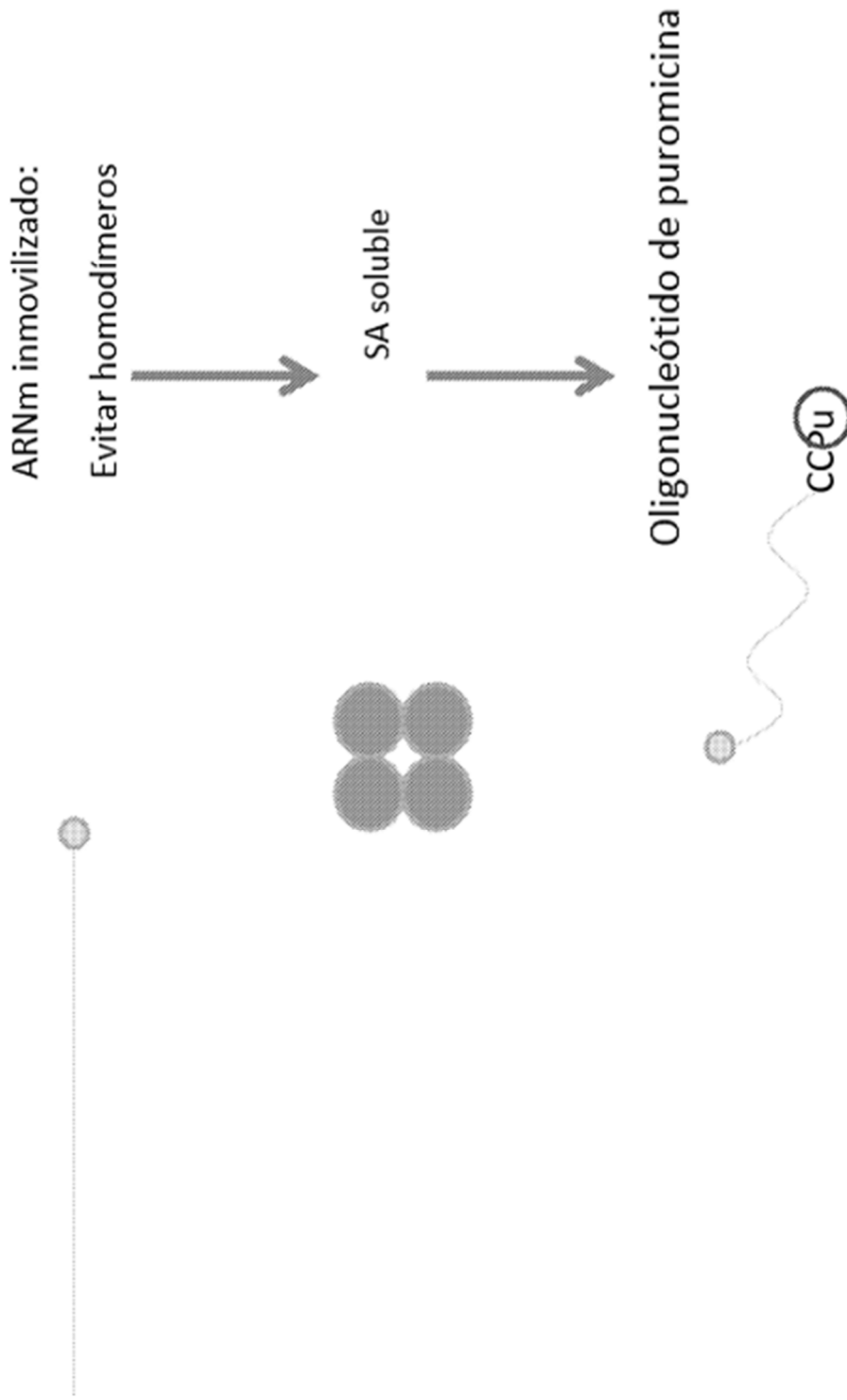


Fig. 12

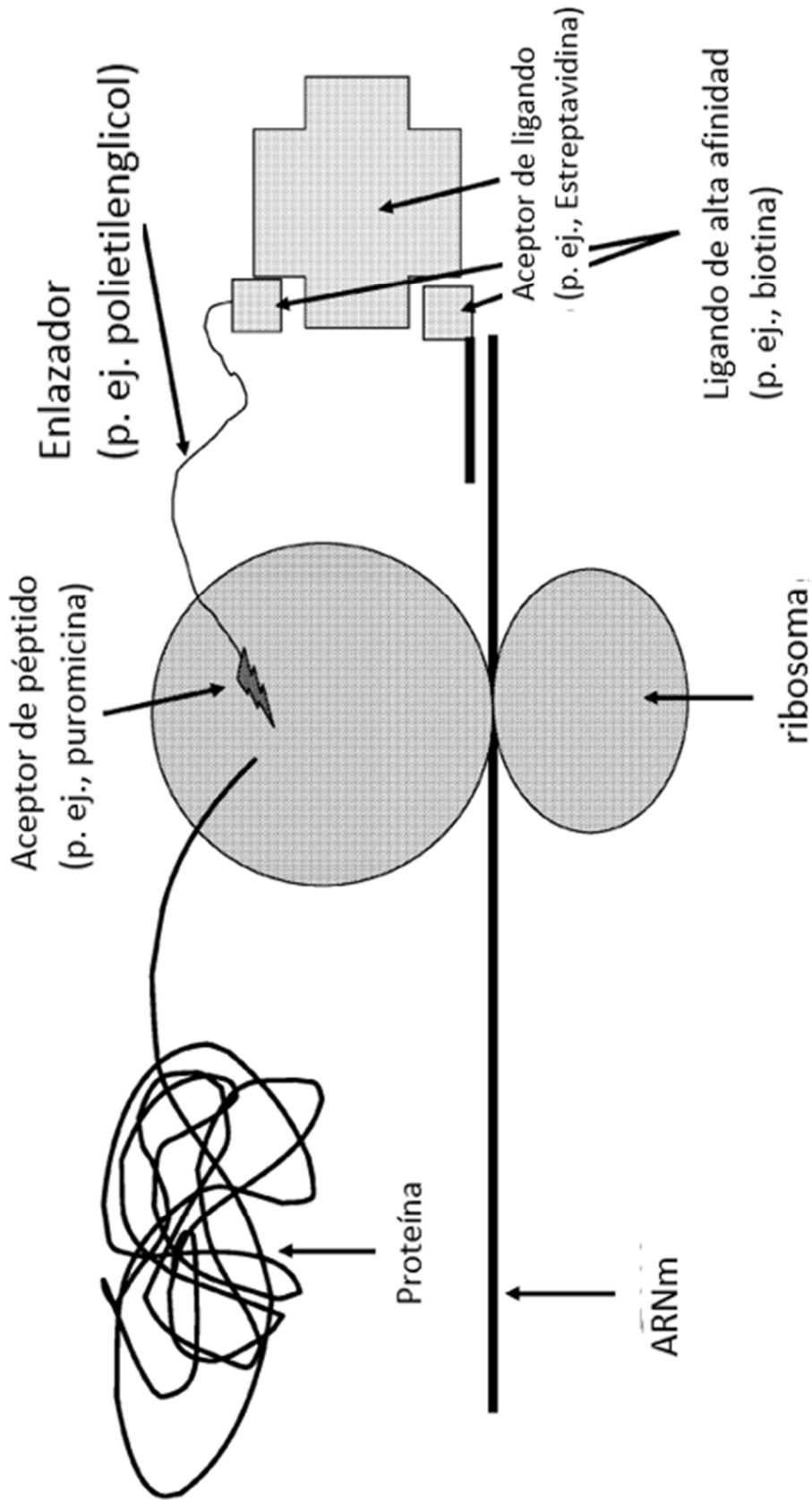


Fig. 13

Diagrama de flujo del procedimiento de visualización X

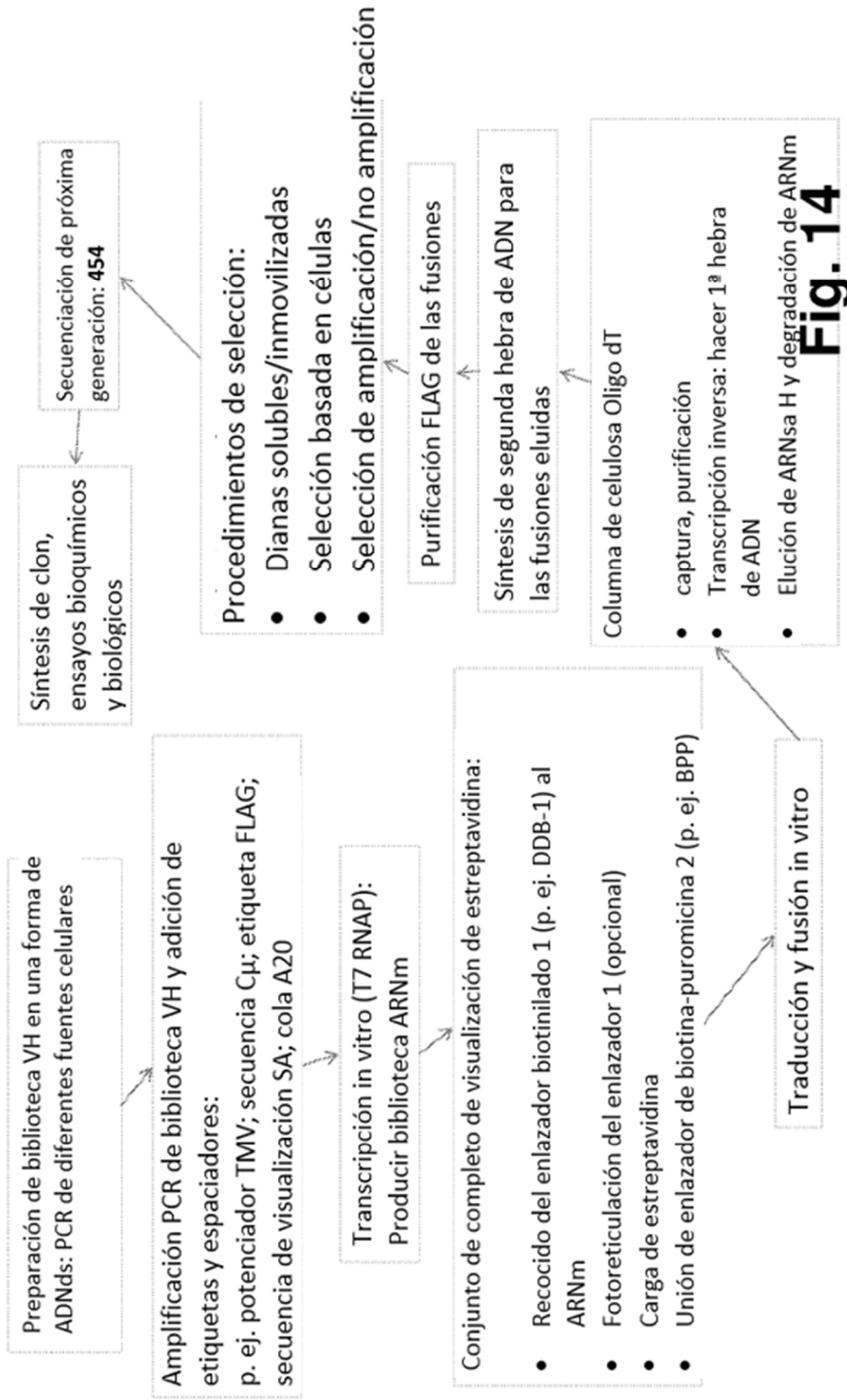


Fig. 14

Ejemplo de un solo clon de la biblioteca de VH

TAATACGACTCACTATA
 GGGACAATTACTATTTACAATTACA AGT
 CTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAAAGTTTCCTGCAAGGCTTCTG
 GATACACCTTCAGTAATAATGCTATACATTTGGGTGGCCAGGCCCCCGACAAAAGGCTTG
 AATGGATGGGATGATCAACGGTGGCAATGGAAACACAGATAATTCACAGAAAATTCAGG
 GCAGAGTCACCAATTACTAGGGACACATCCGGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGATATCTGAAGACACGGCTGTATATTACTGTGCGCATAGACAGTATAGCAGCTCGCCCA
 GCCCTTTTGACCT CTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGG AGT GCA TCC GCC CCA ACC
 GAC TAC AAG GAC GAC GAC AAG TCG TCC TTA GCA TCC GCT A TT TAA AAA AAA AAA AAA
 AAA AAA

Secuencia de inicio de transcripción y traducción

Secuencia de VH

Secuencia de C μ

Secuencia de etiqueta de bandera

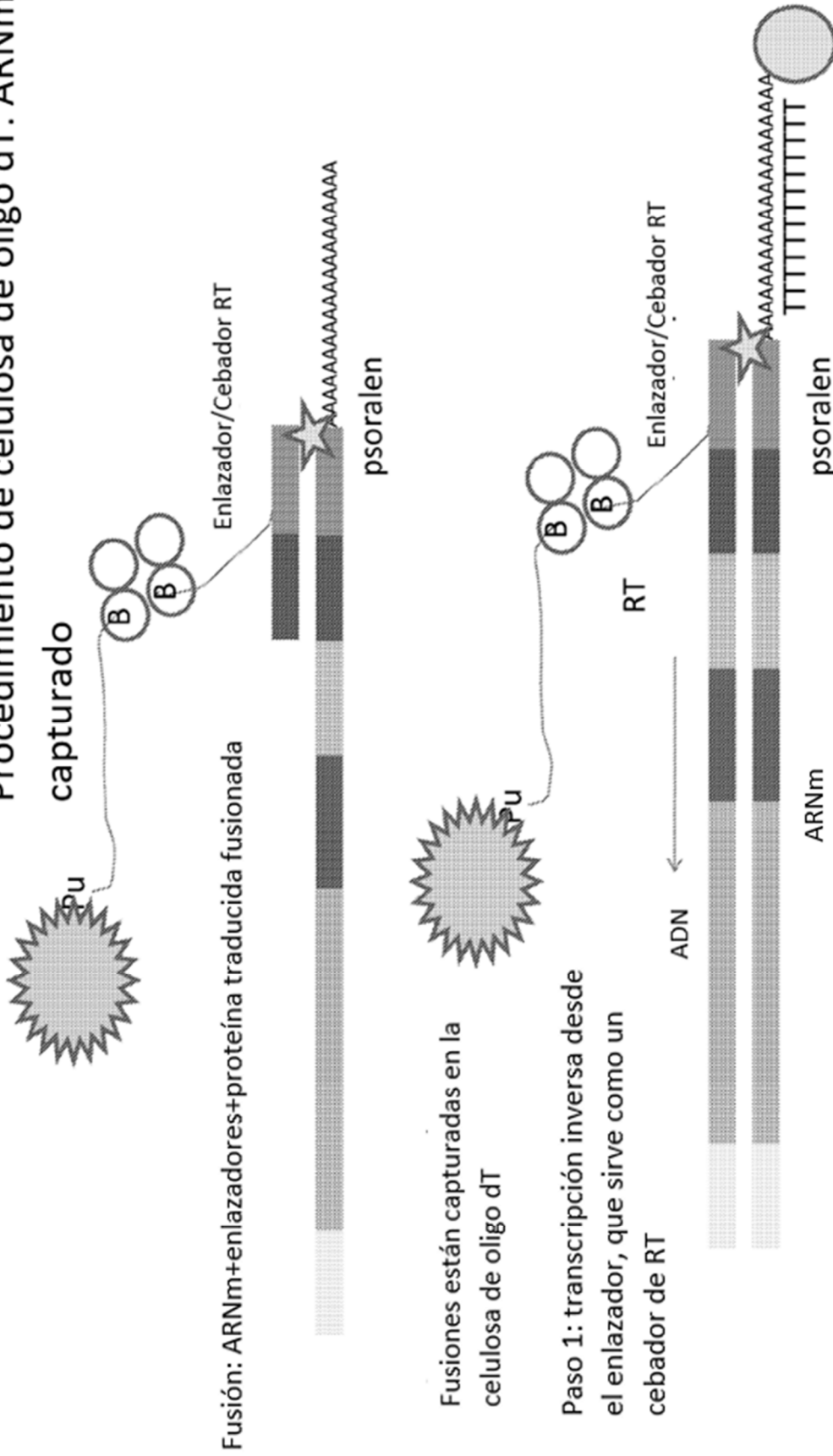
complemento para visualización de ARNm

Sec. de complemento adicional para visualización de SA

XB_S7 T7TMVUTR2
 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA-3'
 XB_S5-1
 5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTAAGGACGACTTGTGCGTCGTCCTTGTA
 GTCGGTTGGGGGGATGCACTCCC-3'
 XB_S6-1
 5'AAATAGCGGATGCTAAGGACGACTTGTGCGTCGTCCTTGTAGTCGGTTGGGGGGGATG
 CACTCCC-3'

Fig. 15

Procedimiento de celulosa de oligo dT: ARNm



Celulosa de Oligo dT

Fig. 16A

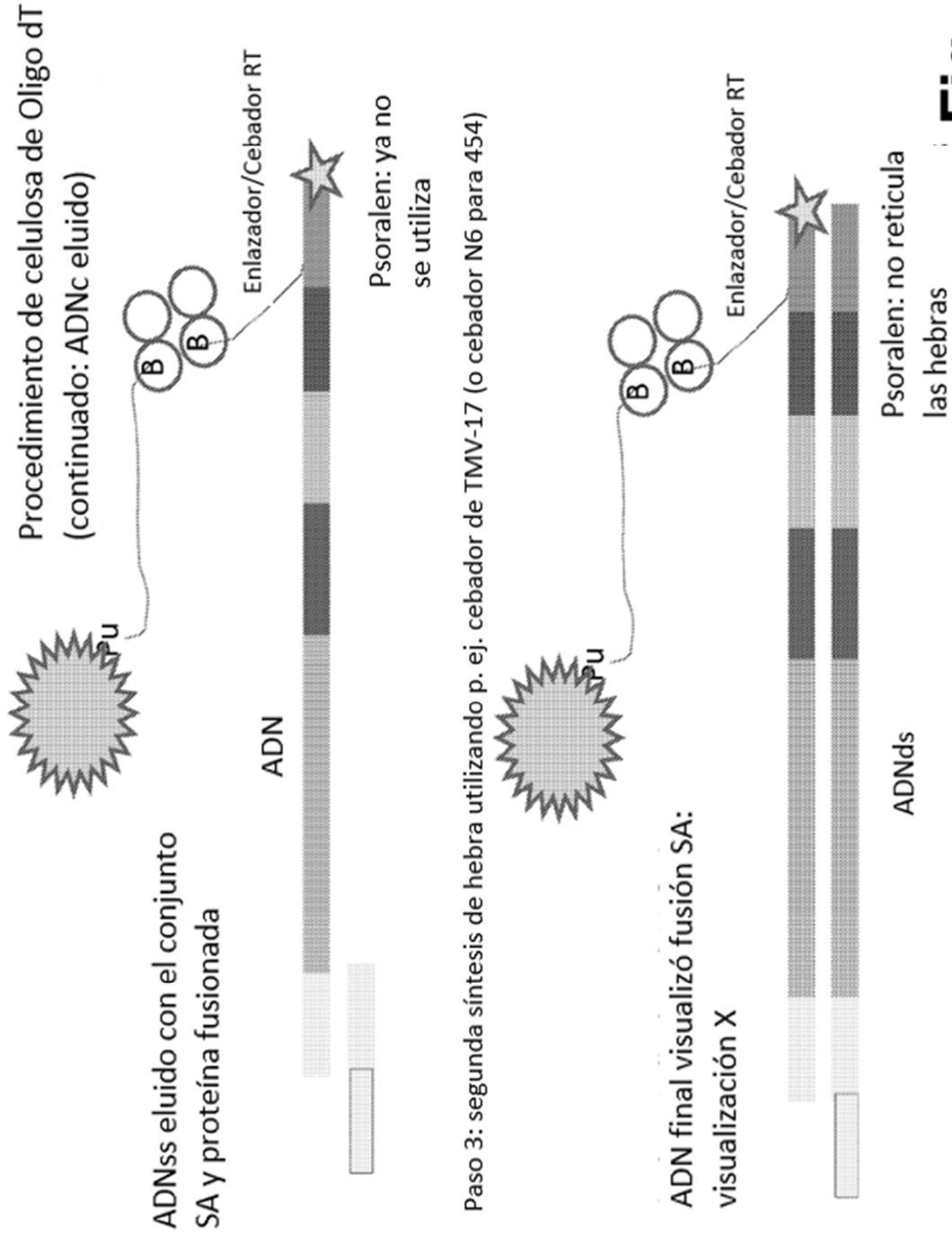


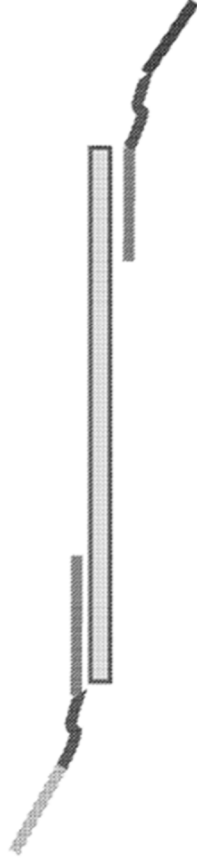
Fig. 16B

Diseño 454

Secuenciación de amplicon Titanio 454: ~400 nts ejecución



Adición de cebadores 454 + secuencias de codificación por PCR



Delantero : GCCTCCCTCGCGCCATCAG (N6) cebador específico a gen

Adaptador 454 "A": GCCTCCCTCGCGCCATCAG

Cebador de secuenciación "A": GCCTCCCTCGCGCCA

Inverso: GCCTTGCCAGCCCGCTCAG (codificación) cebador específico a gen

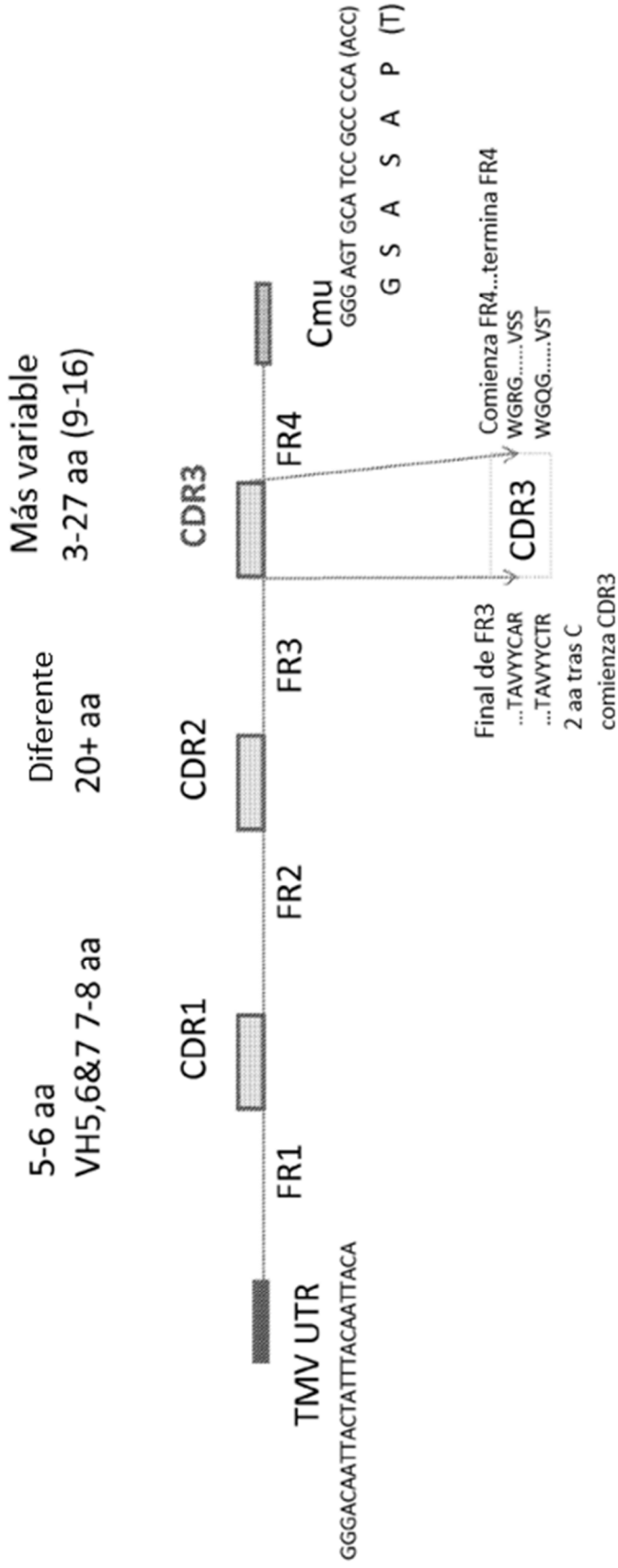
Adaptador 454 "B": GCCTTGCCAGCCCGCTCAG

Cebador de secuenciación "B": GCCTTGCCAGCCCGC

La secuenciación podría realizarse desde cada lado o ambos; elegimos cebador lateral-inverso de cebador B, hebra negativa (ver anteriormente). Las secuencias de calibración están subrayadas (normas internas)

Fig. 17

Segmentos genéticos de dominio VH: aplicación para base de datos de base V de secuenciación 454: estructura de dominios de VH: ver próximos portabojos para alineaciones de secuencia de aminoácido de líneas de gérmenes



Marcos: 7 familias de 51 miembros en total; homología dentro de una familia 70-90%

Fig. 18

Secuenciación de hebra inversa 454 (cebador B)

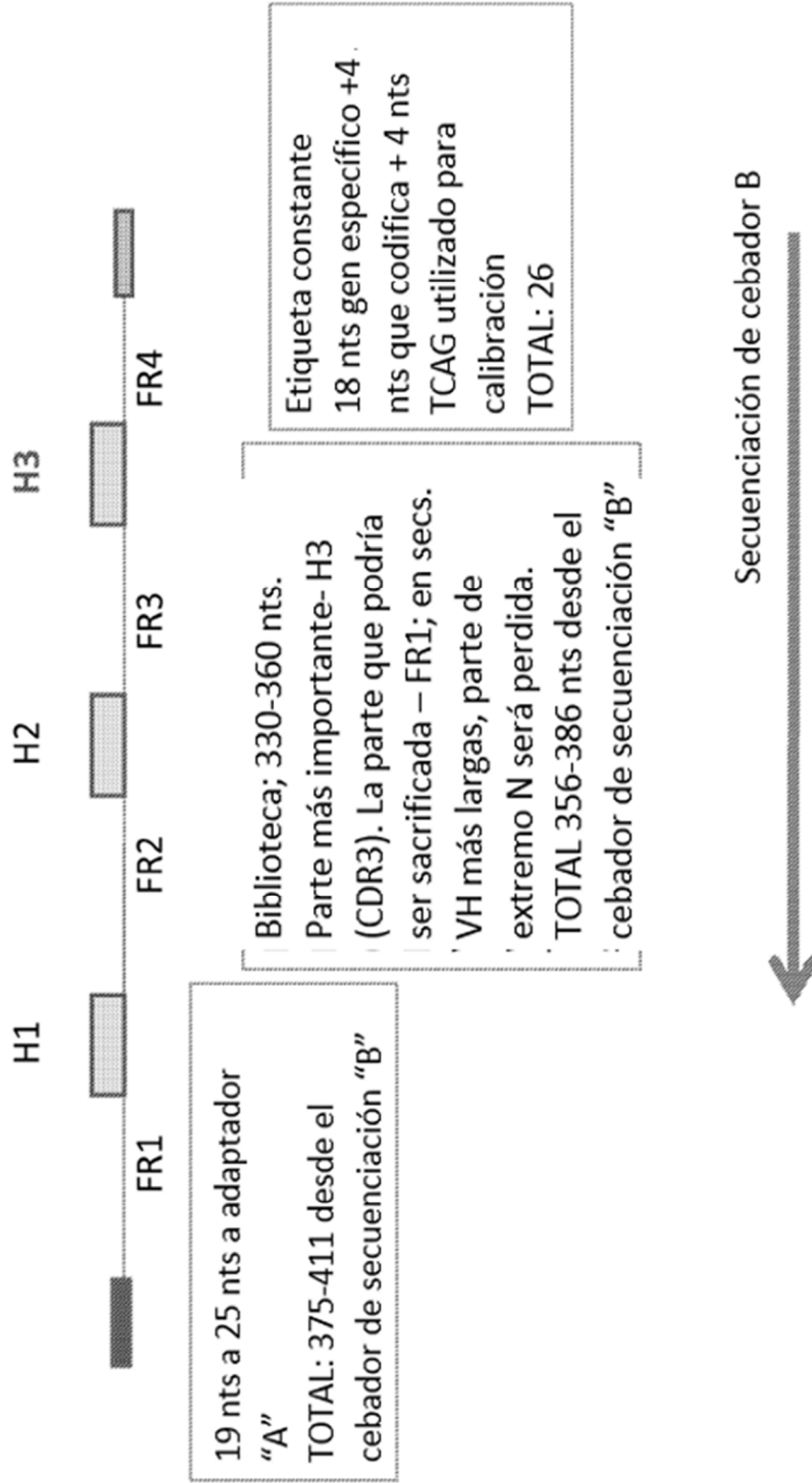
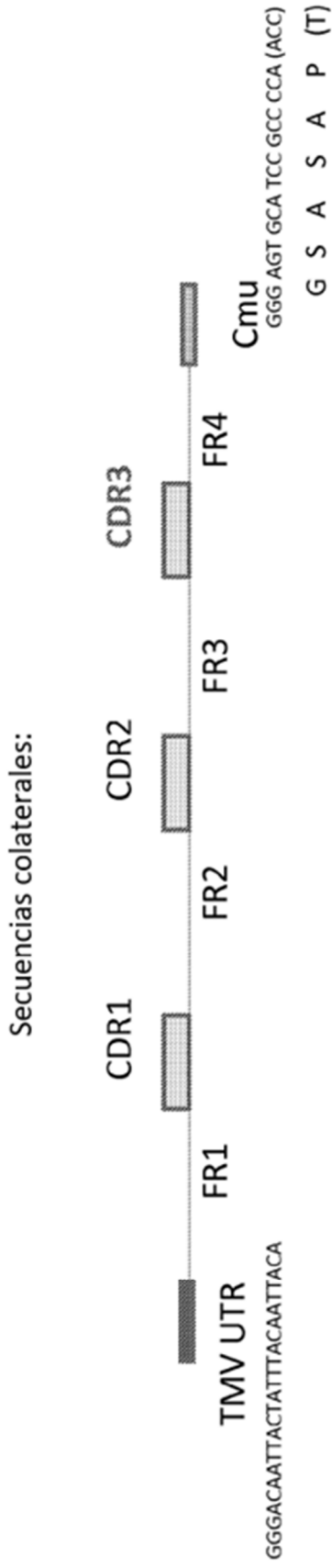


Fig. 19



Hebra negativa inversa TMV como lectura Hebra negativa inversa Cmu como lectura
454 del cebador B: 454 del cebador B:

TGTAATTGTAATAGTAATTGTCCC

TGG GGC GGA TGC ACT CCC

Hebra positiva TMV:

GGGACAATTACTATTACAATTACA

Hebra positiva Cmu

GGG AGT GCA TCC GCC CCA

Fig. 20

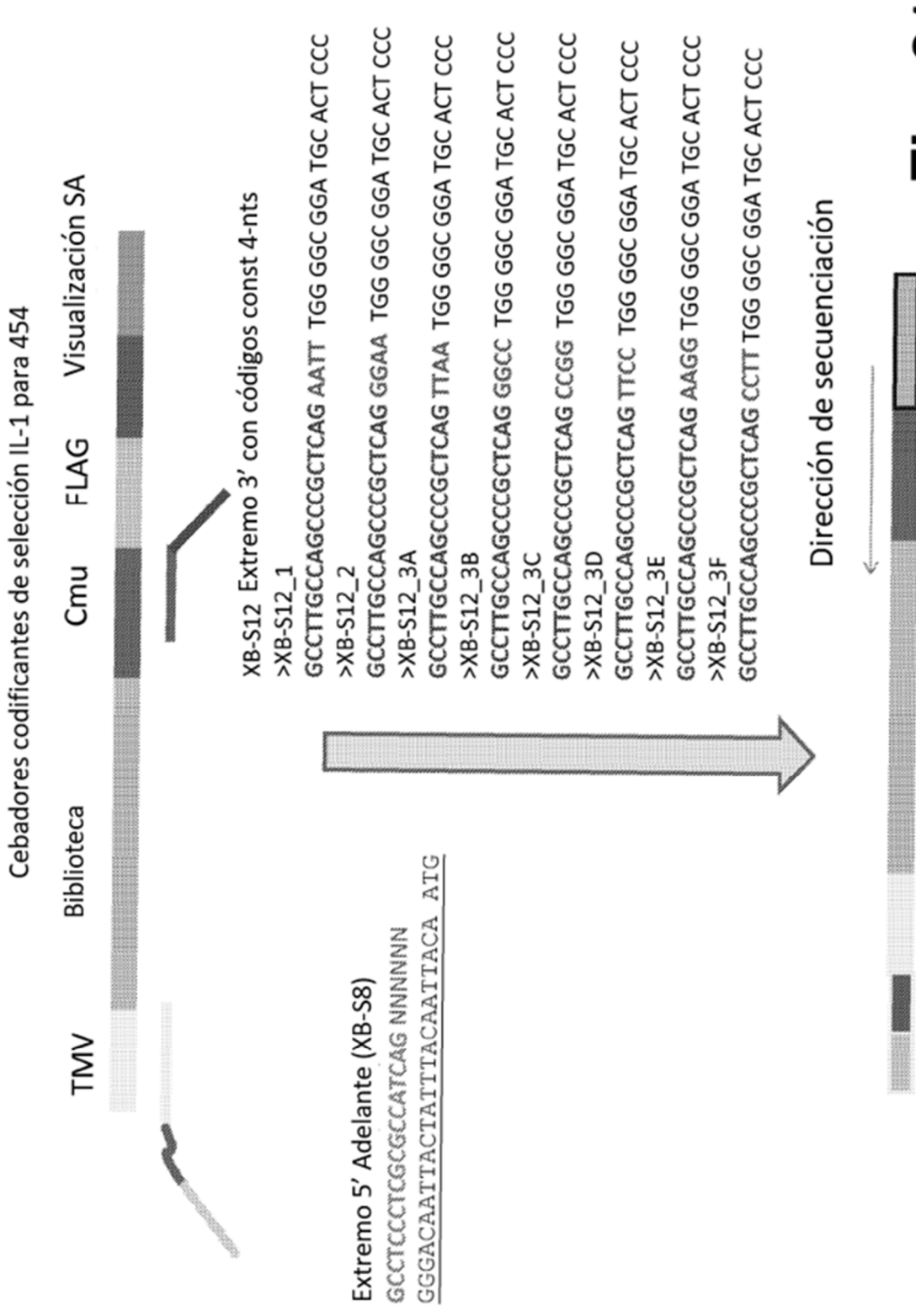


Fig. 21

Ciclo de selección de visualización de ADN: regeneración de la biblioteca de ADN en cada ronda

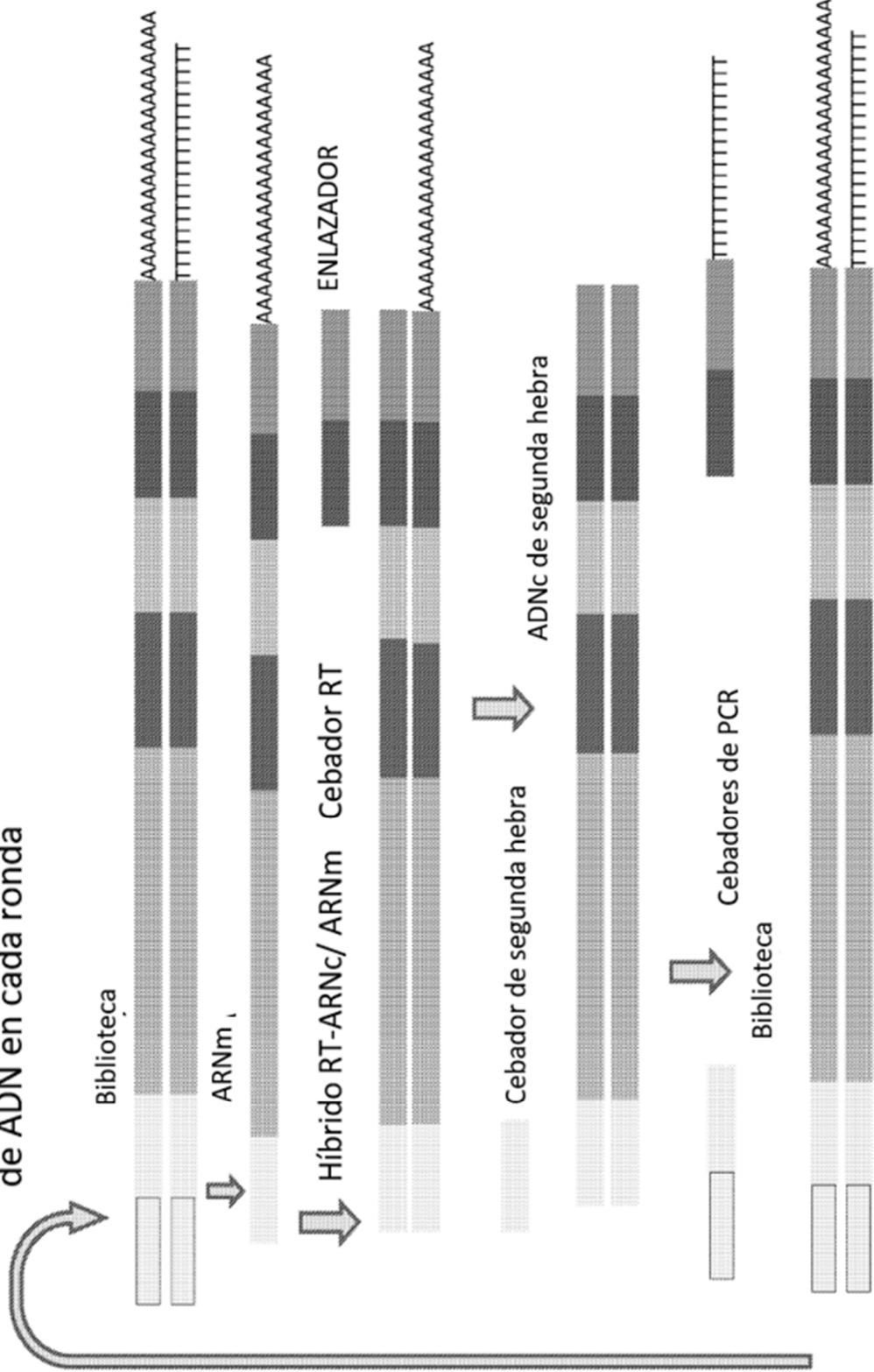


Fig. 22

Sin ciclos de amplificación: varias rondas de selección sin amplificación

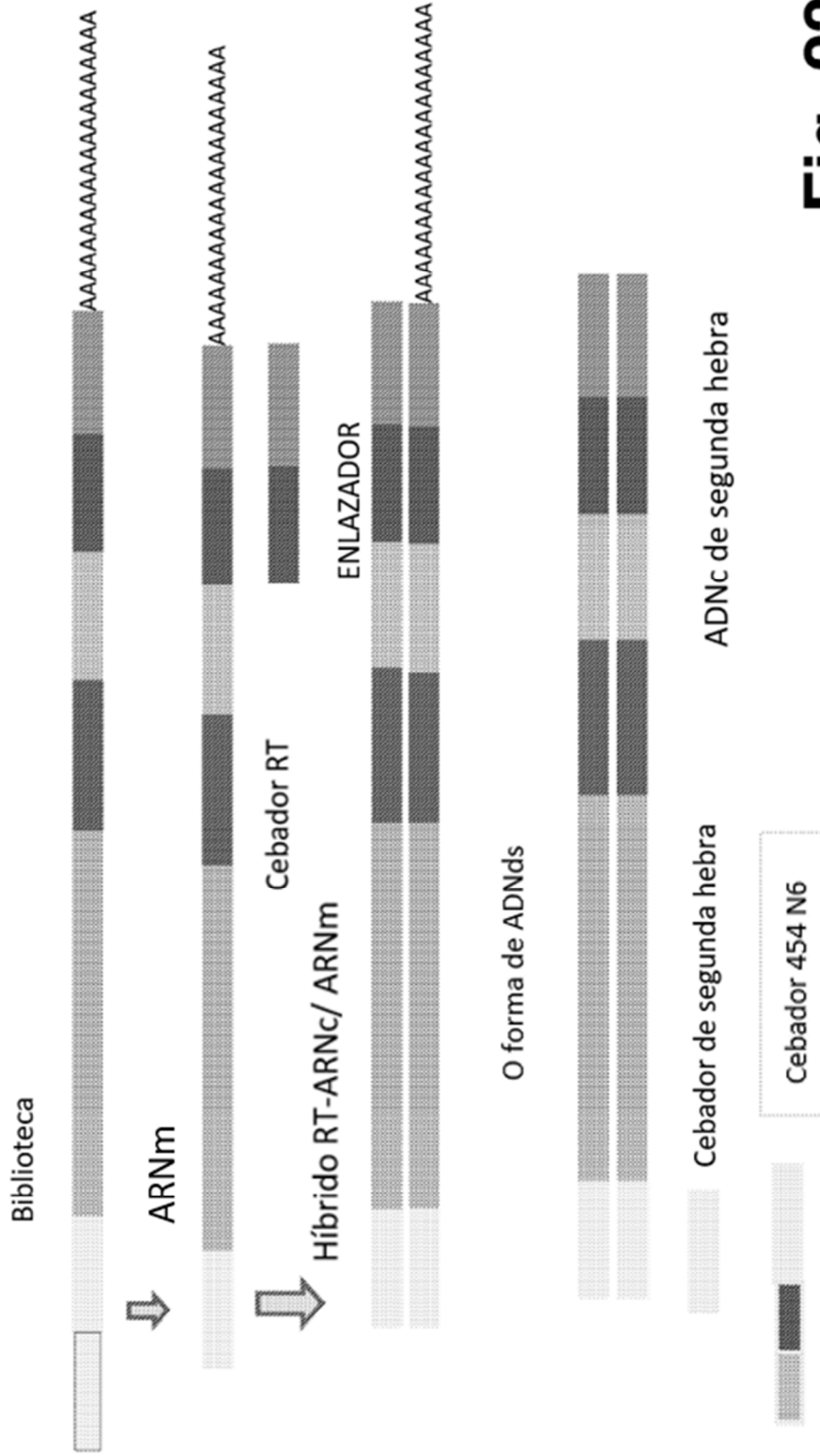
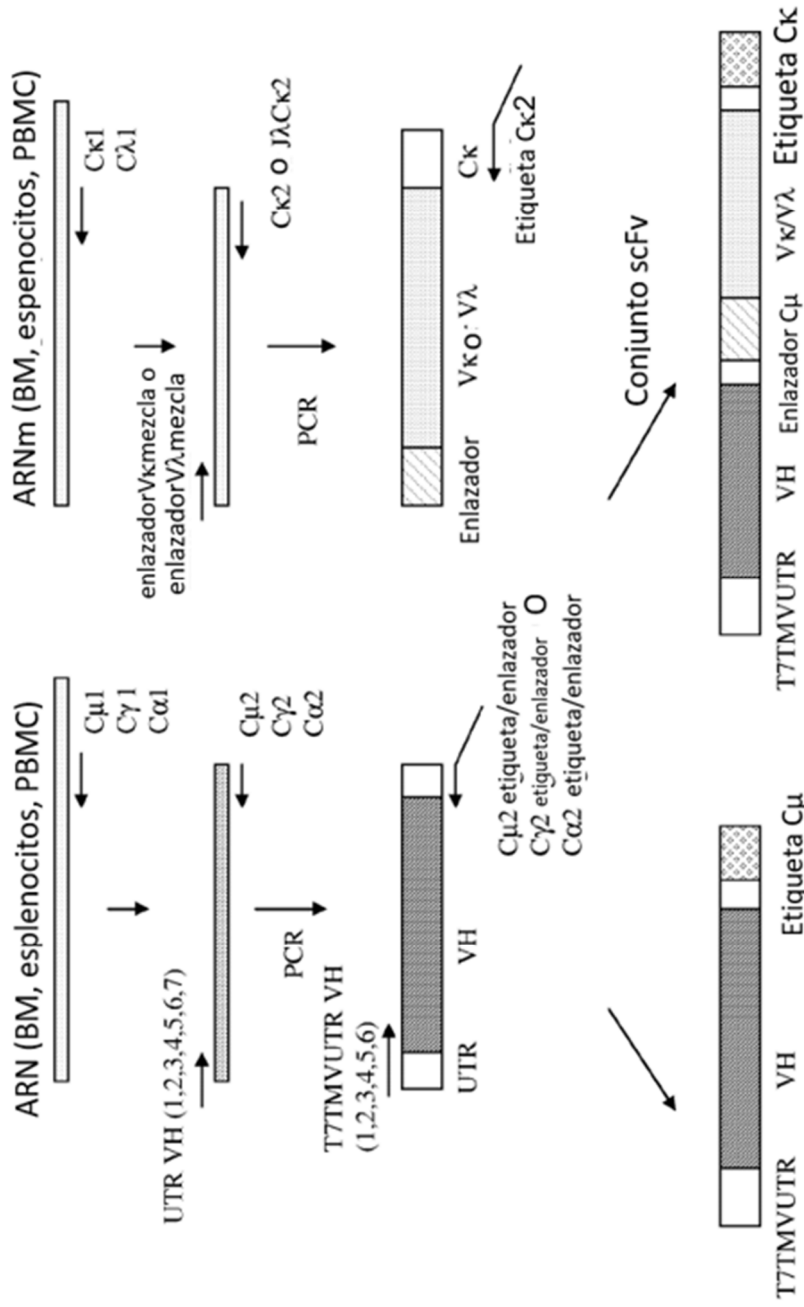


Fig. 23

Diseño de biblioteca de anticuerpo VH y VL



Biblioteca VH naïve
(modificada para fusión)

Biblioteca scFv naïve o enriquecido
(modificada para fusión)

Fig. 24

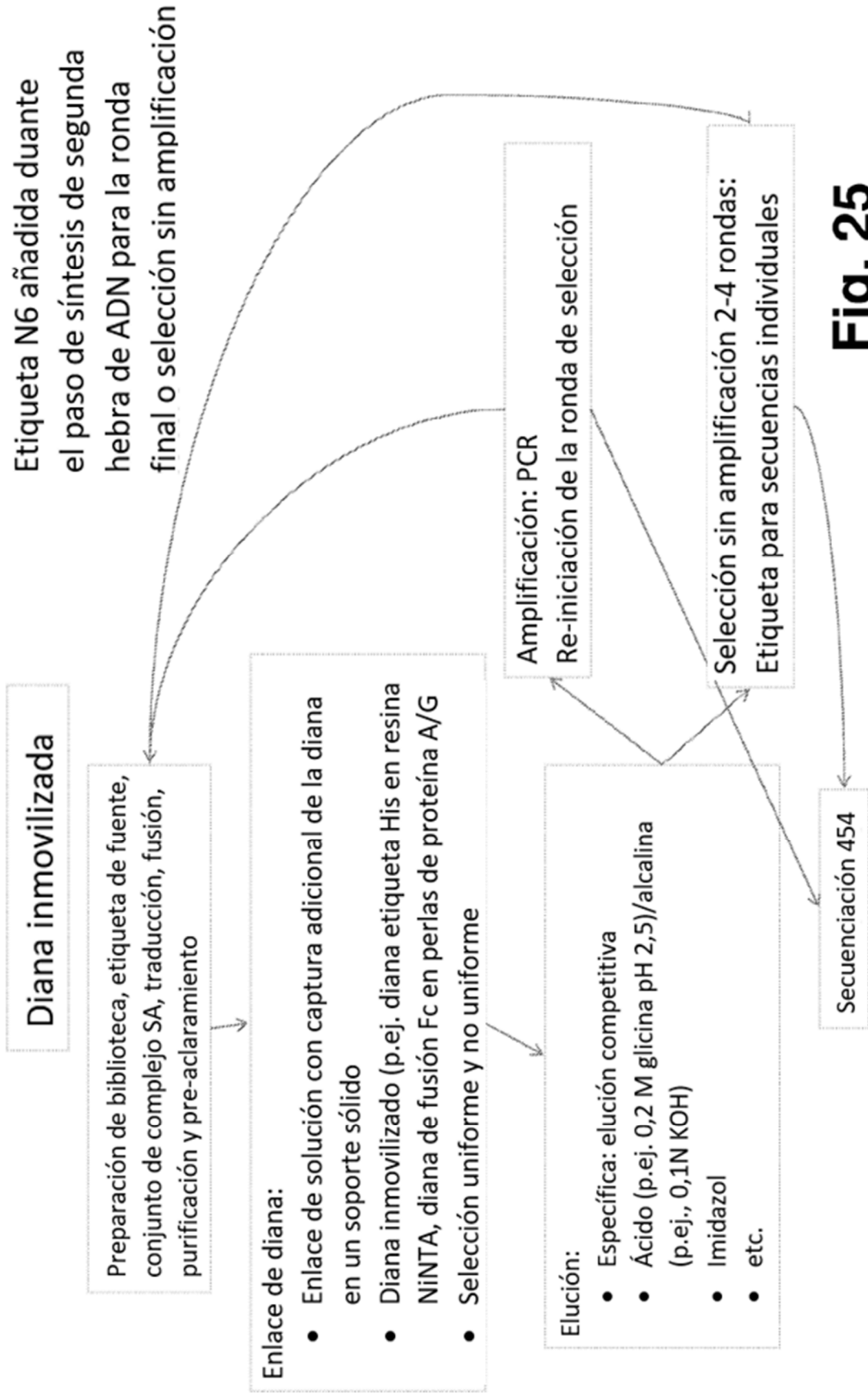


Fig. 25

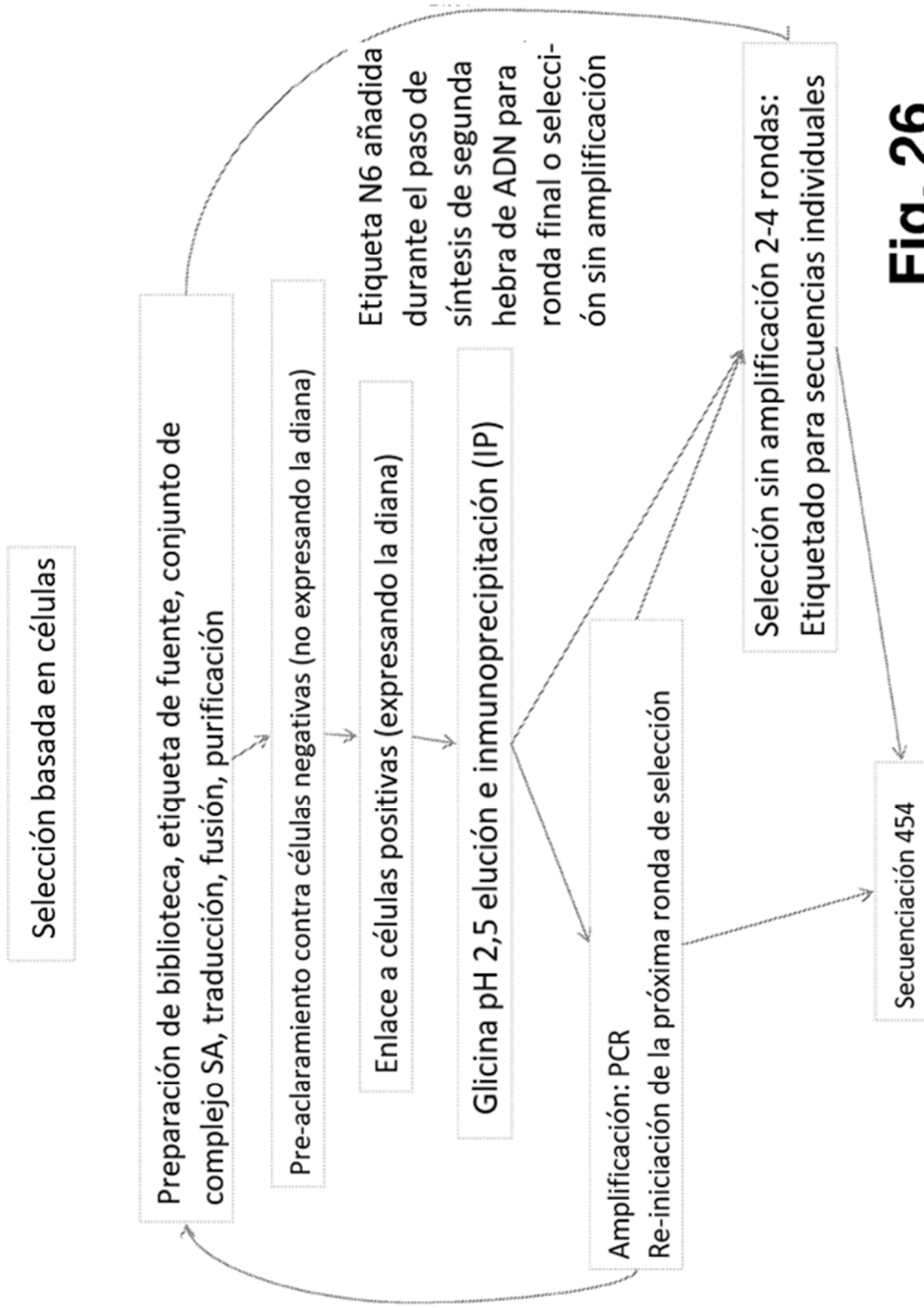
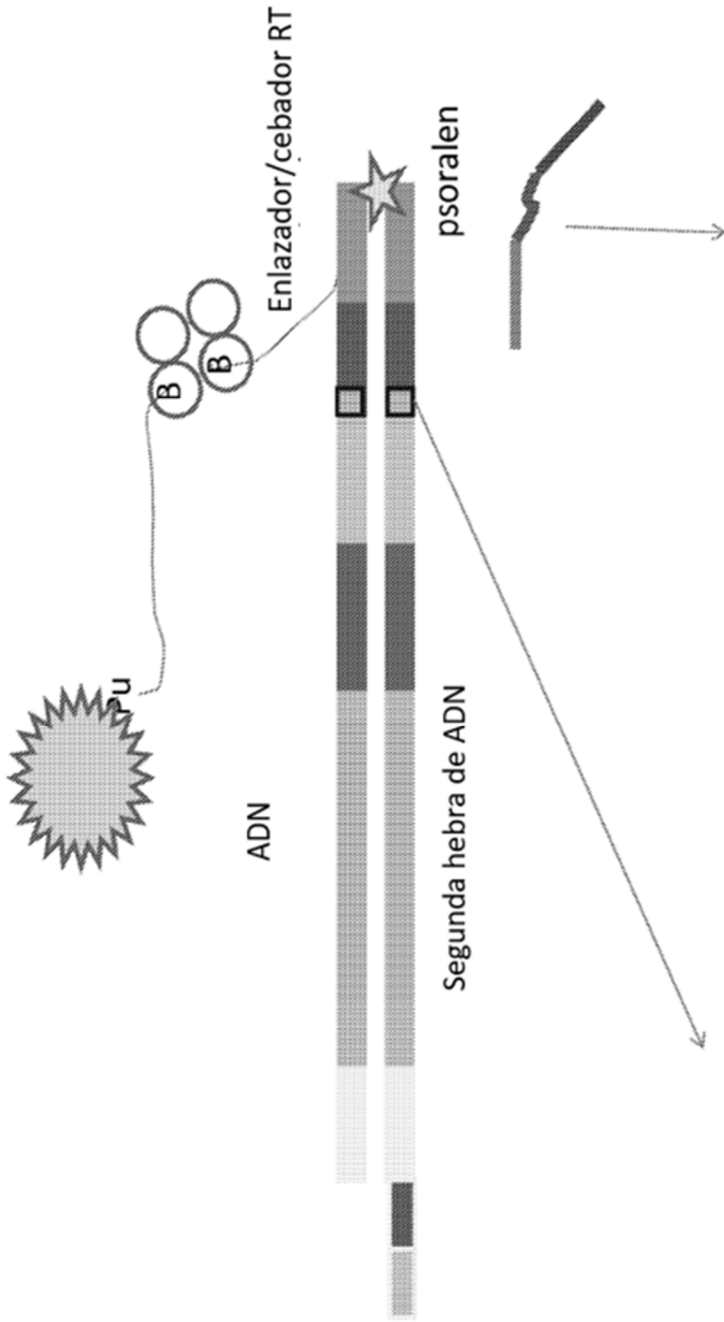


Fig. 26

Fuente de biblioteca y etiquetado de reserva para secuenciación

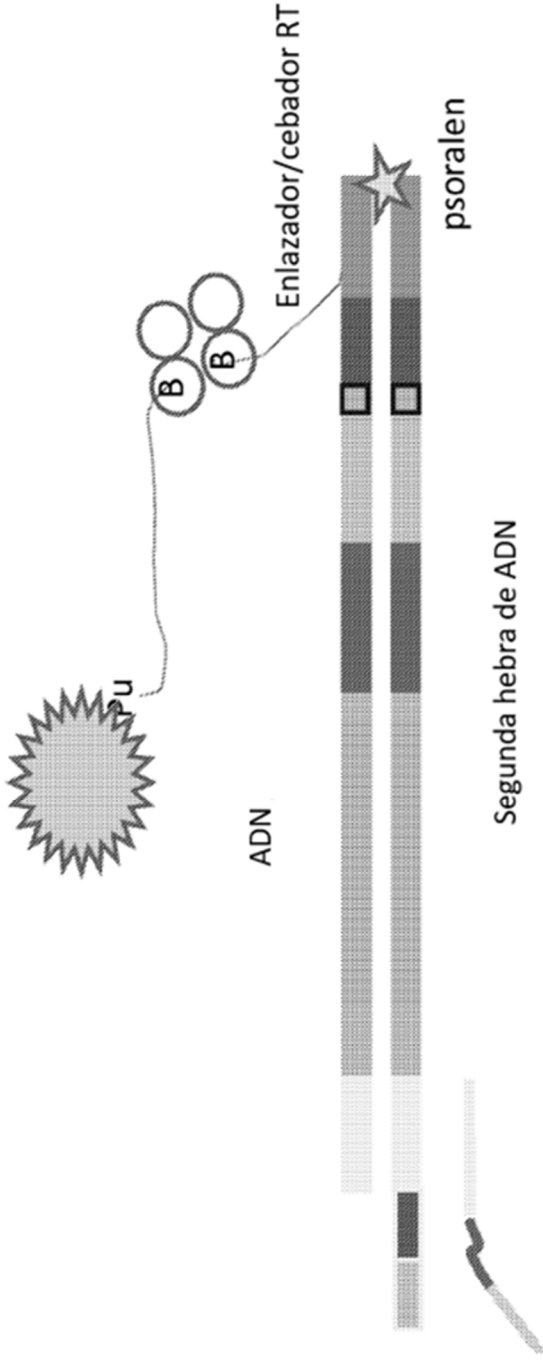


Etiquetado de fuente de biblioteca:
 etiqueta está incluida en la construcción de biblioteca para distinguir la fuente VH como espenocitos, PBMCS, médula ósea

Cebador de PCR con una etiqueta de reserva constante:
 Utilizado para clasificar secuencias de p.ej. rondas diferentes de selección, juntadas para una sola lectura 454.

Fig. 27

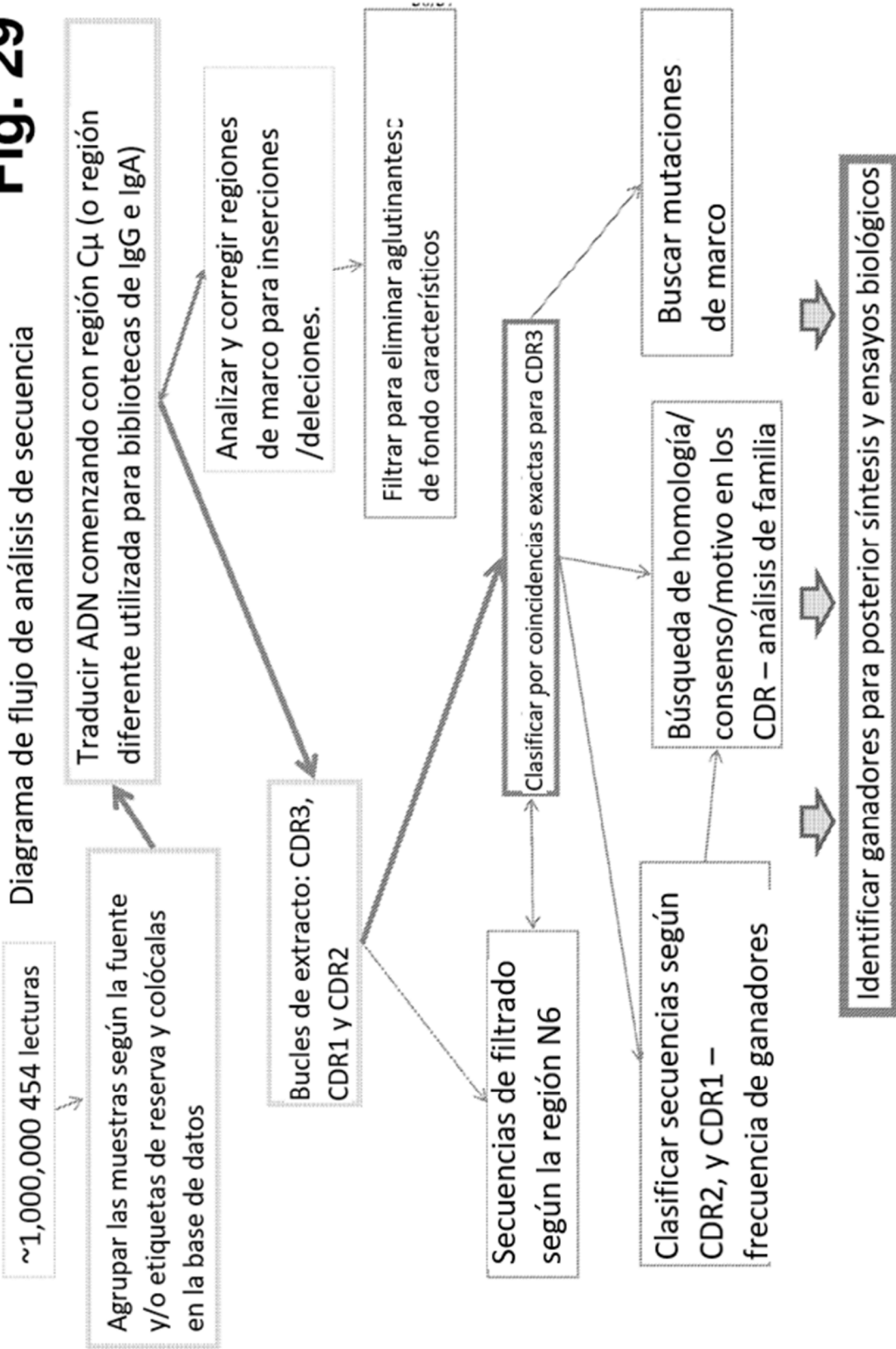
Etiquetado N6 para el filtrado de los artefactos PCR



Cebador N6 para síntesis de segunda hebra de ADN: etiqueta moléculas individuales para distinguir artefactos de PCR de clones enriquecidos en la selección

Fig. 28

Fig. 29



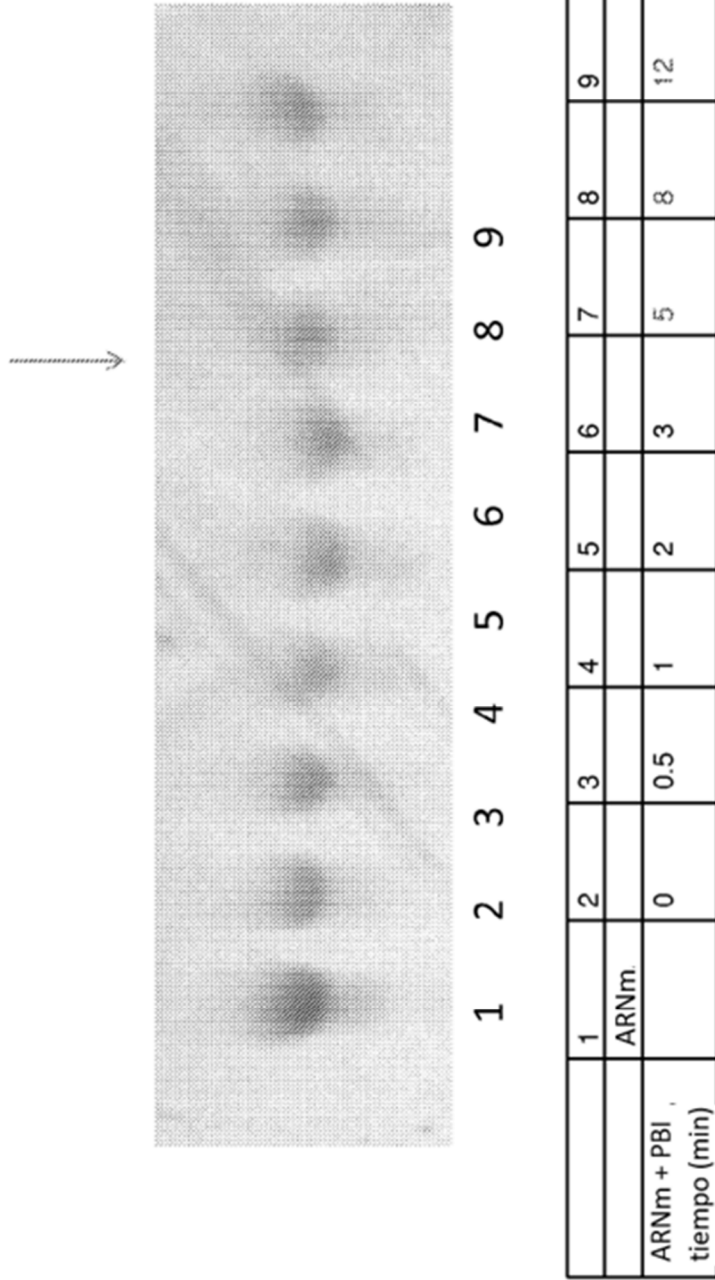


Fig. 30

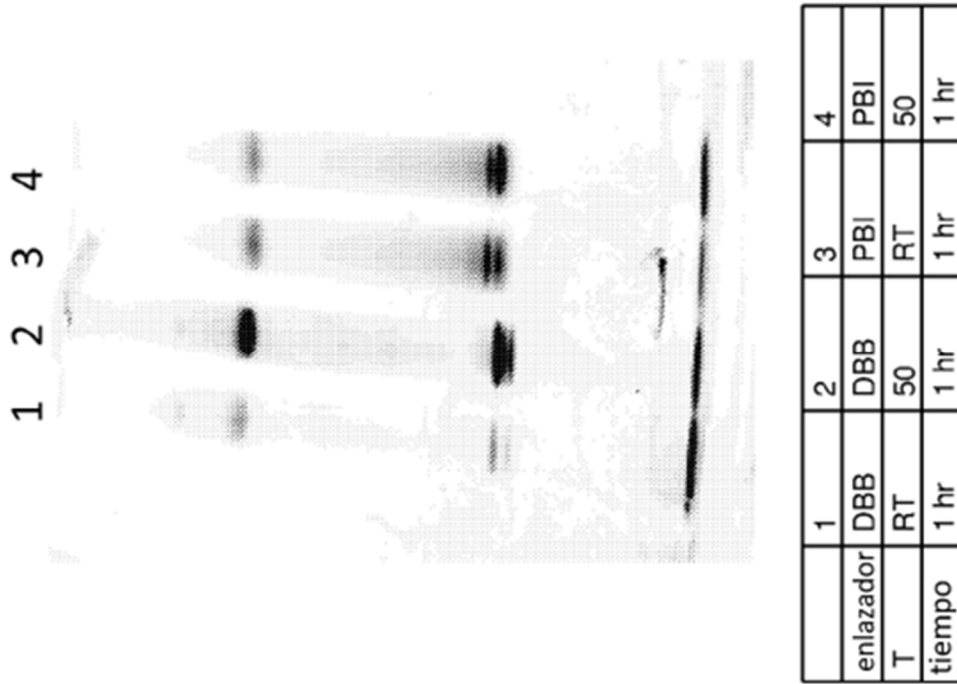
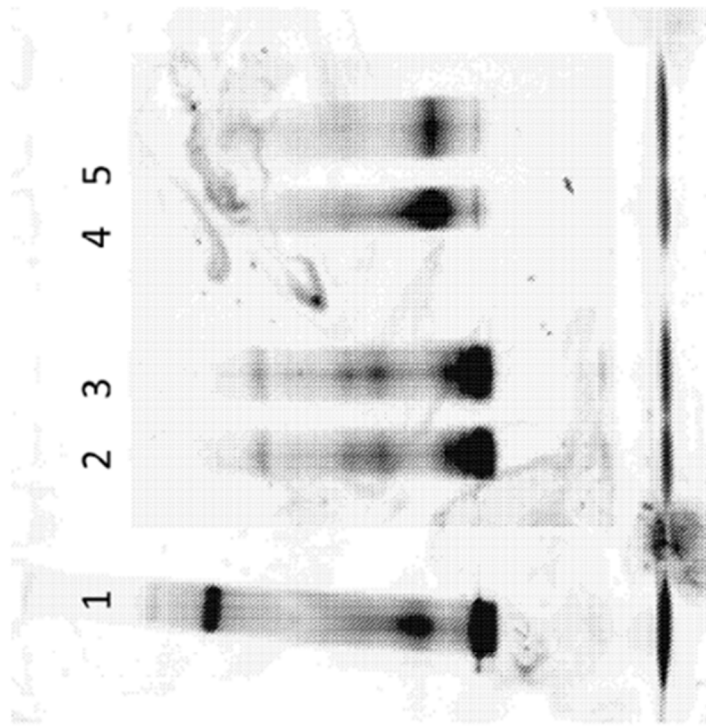


Fig. 31



| | | | | |
|----------|-----------------------------|--------|-----------------|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| conjunto | RT en la columna/ RNAsaH | 2+ KDR | Elución regular | 4 +KDR |

Fig. 32

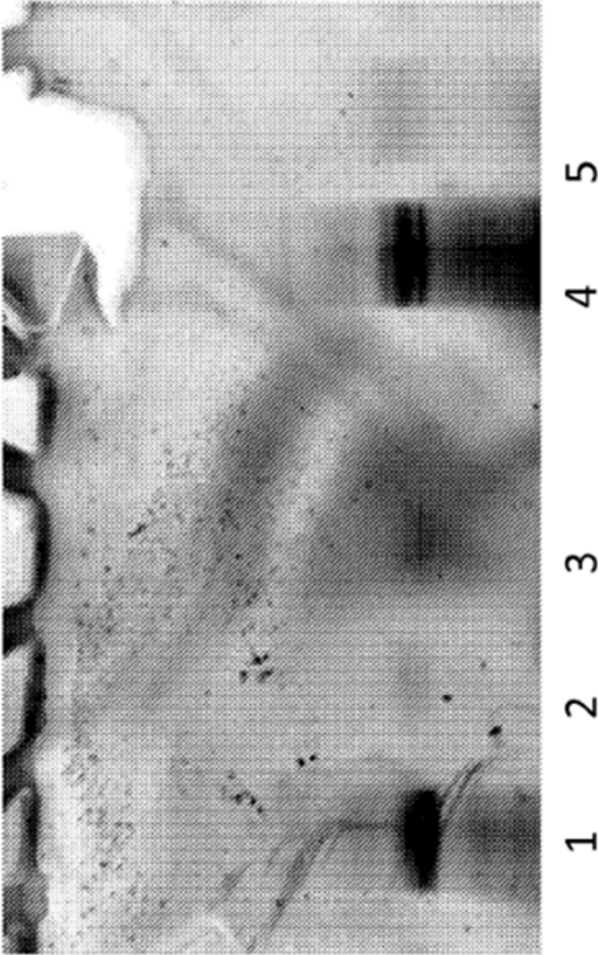
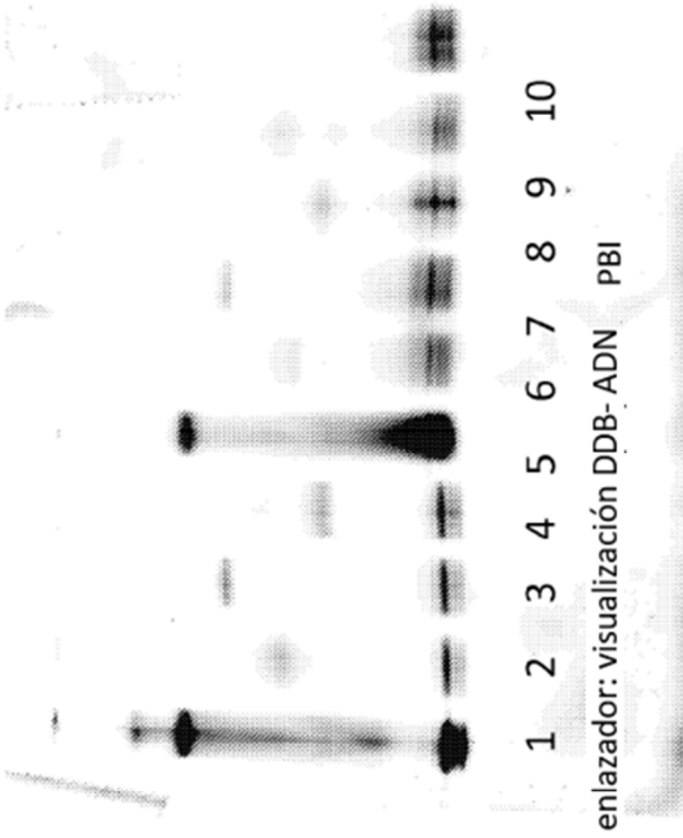


Fig. 33



enlazador: visualización DDB- ADN PBI

| | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------|-----|--------|-----------|----------|-----|--------|----------|-----|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| enlazador | DDB | DDB | DDB | DDB | PBI | PBI | PBI | PBI | PBI | PBI |
| condición | conjunto | RT | ARNsah | :2ª hebra | conjunto | RT | ARNsah | 2ª hebra | RT | ARNsah |
| Cebador RT | | DDB | DDB | DDB | | PBI | PBI | PBI | S6 | S6 |
| Cebador de 2ª hebra | | | | Y7 | | | | Y7 | | |

Fig. 34

Ejemplos de etiquetado de reserva:

Cebadores de extremo 3' con códigos const 4-nts (rojo)

- >1 GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG AATT TGG GGC GGA TGC ACT CCC
- >2 GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG GGAA TGG GGC GGA TGC ACT CCC
- >3A GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG TTAA TGG GGC GGA TGC ACT CCC
- >3B GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG GGCC TGG GGC GGA TGC ACT CCC
- >3C GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG CCGG TGG GGC GGA TGC ACT CCC
- >3D GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG TTCC TGG GGC GGA TGC ACT CCC
- >3E GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG AAGG TGG GGC GGA TGC ACT CCC
- >3F GCCTTGCCAGCCCCGCTCAG CCTT TGG GGC GGA TGC ACT CCC

Cebador B Código de reserva

Ejemplo de etiquetado de molécula individual (para filtrar artefactos PCR): cebador de extremo 5'

5'-GCCTCCCTCGGCCATCAG (NNNNNN) GGGACAATTACTATTTACAATTACAATG-3'

Cebador A N6 aleatorio

TMV

Fig. 35

Fuentes de las células para la amplificación de dominios VH

Total: más de 600 individuos sanos:

| | |
|--------------|------------|
| PBMC | 601 donors |
| Esplenocitos | 13 donors |
| Médula ósea | 10 donors |

Diversidad

| | |
|----------------|----------------|
| Biblioteca VH: | 10^9-10^{10} |
| Biblioteca VL: | 10^6-10^7 |

Diversidad combinatorial: $10^{15}-10^{17}$

- Completamente capturó el repertorio de anticuerpo natural
- La biblioteca de fusión VH representando 100-1000 copias de cada molécula

Fig. 36