



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 218**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99956348 .9**
96 Fecha de presentación : **15.11.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1129354**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2001**

54 Título: **Método para determinar una secuencia mimotopo.**

30 Prioridad: **13.11.1998 EP 98203830**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

73 Titular/es: **PEPSCAN SYSTEMS B.V.**
Edelhertweg 15
8219 PH Lelystad, NL

72 Inventor/es: **Slootstra, Jelle, Wouter y**
Puijk, Wouter, Cornelis

74 Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

ES 2 312 218 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

Método para determinar una secuencia mimotopo.

La invención se refiere a un método para determinar una secuencia mimotopo.

En la actualidad se utilizan en gran medida bibliotecas de diversidad aleatoria para identificar molecular “lead” para diagnóstico, fármacos y vacunas. Cuando la molécula “lead” es un péptido, los métodos utilizados para identificar las moléculas “lead” suelen recibir el nombre de métodos pepsan.

Los métodos pepsan se conocen ya desde los años 80. La teoría en la que se basan estos métodos se describen en los documentos EP-A-0 138 855 y EP-A-0 190 205.

Los aspectos fundamentales del examen de bibliotecas de diversidad aleatoria son su tamaño, es decir, cuántos compuestos diferentes se necesitan para identificar una molécula “lead”, y el método de optimización de la estructura o secuencia de la molécula “lead”. Muchos de los métodos descritos en la literatura parecen basarse en la idea de que cuanto mayor es la biblioteca de diversidad aleatoria, tanto mayor es la probabilidad de encontrar una buena molécula “lead”.

El aspecto respecto del cual más difieren los métodos conocidos es el método de optimización de la molécula “lead”. Una vez sintetizada la molécula de diversidad aleatoria, se puede comprobar su actividad deseada. Es posible, por supuesto, elegir como molécula “lead” el elemento de la biblioteca de diversidad aleatoria que obtiene el valor más elevado para dicha actividad deseada. Sin embargo, muchos de los métodos comprenden etapas para optimizar la estructura de dicho elemento que presenta la actividad más elevada, con el fin de llegar a una molécula “lead” que presenta una actividad incluso superior.

Las bibliotecas minipepsan, que constan solamente de unos pocos millares de péptidos, se han utilizado para identificar moléculas “lead” que se optimizaron rápidamente a moléculas que tenían una actividad similar a la de moléculas conseguidas partiendo de bibliotecas constituidas por millones de compuestos. Esto se describe en Slootstra *et al.*, Molecular Diversity, 1 (1995b) 87-96 y en Slootstra *et al.*, J. Mol. Recogn., 10, 217-224. Otras técnicas de referencia se describen p. ej. en los documentos US 5,814,74 A, US 5,645,996 A, US 5,582,897 A, US 5,565,325 A, US 5,556, 762 A, Immunotechnology (1995) 1 175-187 y J. Immunol. Mtds (1995) 187 179-188 (1997). En estos artículos, se ha mostrado que las pequeñas bibliotecas, combinadas con métodos de optimización basados en pepsan son herramientas valiosas para identificar y optimizar moléculas “lead”.

La presente invención pretende ofrecer un método mejorado para identificar y optimizar una molécula “lead”.

Se ha observado que se obtiene una mejora objetiva partiendo de una biblioteca de moléculas de prueba conocidas, evaluando la actividad de dicha biblioteca y optimizando la estructura de unas pocas moléculas de prueba que muestran la mayor actividad, sustituyendo de forma metódica cada bloque de construcción de la estructura de las moléculas de prueba por otros bloques de construcción posibles. Por consiguiente, la invención se refiere a un método para determinar una secuencia mimotopo para un receptor que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una biblioteca de secuencias de prueba compuesta por bloques de construcción elegidos dentro del grupo de los aminoácidos, monosacáridos y nucleótidos;

b) determinar la actividad de cada secuencia de prueba de la biblioteca respecto del receptor;

c) identificar una secuencia de prueba que contiene en cierta posición un bloque de construcción, que, según los resultados de la etapa b, muestra una actividad de fijación respecto del receptor;

d) obtener otra biblioteca de secuencias de prueba, basada en la secuencia de prueba identificada en la etapa c, sustituyendo un bloque de construcción en posiciones elegidas de la secuencia de prueba identificada, por bloques de construcción elegidos;

e) determinar la actividad de cada secuencia de prueba de la biblioteca obtenida en la etapa d) respecto del receptor;

f) identificar una secuencia de prueba que contiene en cierta posición un bloque de construcción que, según los resultados de la etapa e), muestra una actividad de fijación respecto del receptor;

g) repetir las etapas de d)-f) para la biblioteca de secuencias de prueba obtenida en la etapa d), durante cierto número de ciclos hasta que se encuentra en la etapa f) una secuencia mimotopo que presenta una actividad de umbral respecto del receptor, reduciéndose en cada ciclo la cantidad de receptor utilizado para determinar la actividad de las secuencias de prueba respecto de dicho receptor; cada secuencia de prueba se sitúa en una mini tarjeta o medio de soporte plano.

Se ha visto que el presente método conduce, de forma adecuada, a una secuencia mimotopo que tiene una fuerza de fijación muy elevada al receptor deseado. En algunos casos, en los que se conoce el epítipo exacto (es decir la secuencia parcial de un antígeno que proporciona fijación a un anticuerpo), se ha visto que el presente método conduce a la estructura exacta del epítipo en unas pocas etapas sólo.

Según la invención se determina una secuencia mimotopo para un receptor. En este contexto, una secuencia de mimotopo se define como una molécula que muestra cierta actividad mínima, deseada en presencia de un receptor dado. Un ejemplo de ello es la determinación de la secuencia de epítipo de un antígeno para cierto anticuerpo. Sin embargo, en algunos casos, puede ser suficiente que se mimetice el epítipo exacto y que baste una fuerza de fijación ligeramente inferior de la molécula hallada con el receptor.

La secuencia de mimotopo será una molécula compuesto por cierto número de bloques de construcción, donde el número y orden de los bloques de construcción controlan las propiedades de la molécula. Como ejemplos de tipos de secuencias de mimotopo que se pueden determinar según la invención, se pueden citar los péptidos, que tienen posiblemente estructuras esteroideas o similares a sacáridos conectados a los mismos, sacáridos, ADN (oligonucleótidos) y APN (ácidos nucleicos similares a los péptidos). Por consiguiente, los bloques de construcción se eligen dentro de los grupos de aminoácidos (tanto los aminoácidos naturales como los no naturales) monosacáridos y nucleótidos.

El receptor para el cual se determina una secuencia de mimotopo según la invención puede ser cualquier compuesto, composición, microorganismo o muestra de tejido respecto del cual uno de los tipos de secuencias de mimotopo puede mostrar cierta actividad que se puede medir, como actividad de fijación. Como ejemplos adecuados de receptores se pueden mencionar los anticuerpos (tanto los monoclonales como los policlonales), proteínas, como enzimas, células, receptores de hormonas y microorganismos.

La primera etapa en un método según la invención es disponer de una biblioteca de secuencias de prueba. Por supuesto, estas secuencias de prueba están compuestas por el mismo tipo o clase de bloques de construcción que la secuencia de mimotopo objetivo. De preferencia, las secuencias de prueba se conocen porque aunque se pueden elegir aleatoriamente, su composición y estructura es conocida.

Esto realizar generando, p. ej. a mano o mediante ordenador, cierto número de secuencias y sintetizando las secuencias así obtenidas. También es posible derivar la biblioteca de secuencias de prueba de un compuesto se sabe que tiene una actividad favorable respecto del receptor. En principio, cualquier forma de elección de secuencia de prueba para realizar la biblioteca resulta adecuada.

La longitud de las secuencias de prueba depende de la naturaleza de los lotes de construcción que constituyen las secuencias y de la naturaleza del receptor así como de la actividad deseada respecto de dicho receptor. Para muchos casos, resultará adecuada una longitud de 3 a 20 bloques de construcción.

El número de secuencias de prueba que constituye la biblioteca será lo suficientemente grande para proporcionar datos suficientes para llegar a una buena secuencia de mimotopo en un número aceptable de etapas/ciclos. Por otra parte, dicho número será lo suficientemente pequeño para garantizar que los datos obtenidos se pueden manipular de forma adecuada. Por lo general, el número de secuencias de prueba en la biblioteca oscilará entre 500 y 100.000 de preferencia entre 1000 y 10000.

Una vez que se ha generado el número deseado de secuencias de prueba, se pueden sintetizar dichas secuencias de prueba. Estos se pueden realizar de cualquier forma conocida, p. ej. en la forma descrita por Slootstra *et al.* en Molecular Diversity, 1 (1995b) 87-96. También es posible, por su puesto, utilizar una biblioteca ya disponible, p. ej. porque se ha utilizado en una aplicación anterior del presente método. En este caso, las secuencias de prueba no se tendrán que sintetizar.

Las secuencias de prueba se sintetizan utilizando una mini tarjeta o un medio de soporte plano.

La etapa siguiente de un método según la invención es la determinación de la actividad de cada secuencia de prueba de la biblioteca respecto del receptor. La forma en la que se realiza esta determinación dependerá de la interacción específica entre la secuencia del mimotopo y el receptor que se pretende y de la naturaleza del receptor y los bloques de construcción de la secuencia de mimotopo. Por ejemplo, si la actividad deseada es la fijación de la secuencia de mimotopo al receptor y la secuencia de mimotopo es un péptido y el receptor es un anticuerpo monoclonal, la determinación puede realizarse convenientemente en una prueba ELISA en solución o sobre soporte sólido. Otros métodos adecuados para determinar la actividad son: BIACORE y AFM (Atomic Force Microscope). El experto en la materia podrá elegir una forma adecuada de determinar la actividad, dado cierto receptor y la naturaleza de la secuencia de mimotopo.

Entre los resultados de la determinación de las actividades de las secuencias de prueba de la biblioteca, se elegirá por lo menos una secuencia de prueba para formar una base para las etapas restantes del presente método. Dicha secuencia de prueba (al menos una) se elige, según la invención, identificando en cierta posición un bloque de construcción que, según se aprecia por los resultados de la determinación de la actividad queda favorecido en dicha posición. En este respecto, la expresión "en cierta posición un bloque de construcción que queda favo-

ES 2 312 218 T3

recido en dicha posición” significa que las secuencias de prueba que tienen en la citada posición, el mencionado bloque de construcción muestran una actividad elevada respecto del receptor, comparado con las demás actividades halladas.

- 5 Es posible que la al menos una secuencia de prueba que se identifique haya sido sometida a prueba para determinar su actividad respecto del receptor y muestre una actividad elevada en comparación con las demás actividades halladas.

También es posible que la, al menos una, secuencia de prueba que se identifica no haya sido probada en sí misma. Esto se puede explicar del siguiente modo. Por ejemplo, puede haberse visto que una secuencia de prueba que tiene en la posición 2 un bloque de construcción A muestre una actividad muy elevada respecto del receptor. Puede haberse visto además que una secuencia de prueba que tiene en la posición 4 un bloque de construcción B muestre también una actividad muy elevada respecto del receptor. La, al menos una, secuencia de prueba que se va a identificar puede ser por tanto una secuencia que comprende el bloque de construcción A en la posición 2 y el bloque de construcción B en la posición 4. No obstante, puede muy bien ser que esta secuencia misma no haya sido evaluada todavía en lo que respecta su actividad para con el receptor. Por lo general, el número de secuencias de prueba identificado para tomarlo como base de las etapas restantes de un método según la invención oscilará entre 1 y 150. Un número de secuencias de prueba más elevado conducirá a mejores resultados pero resultará relativamente incómodo de manejar. De preferencia dicho número oscilará entre 1 y 25. El experto en la materia podrá decidir el número de secuencias de prueba elegido en función de la calidad deseada del resultado del método y de las facilidades disponibles para llevarlo a cabo.

Sobre la base de las secuencias de prueba identificadas se proporciona, en un análisis denominado de sustitución, otra biblioteca de secuencias de prueba. Esto se hace variando los bloques de construcción en las posiciones de las secuencias de prueba identificadas, es decir sustituyendo un bloque de construcción en unas posiciones elegidas de la secuencia de prueba identificada por unos bloques de construcción elegidos.

Por ejemplo, en su forma más sencilla el análisis de sustitución se realiza del siguiente modo. En el caso de que las secuencias de prueba sean dodecapéptidos de aminoácidos naturales, en primer lugar, se puede cambiar el bloque de construcción en la posición 1 de uno de los dodecapéptidos elegidos en cada uno de los 20 aminoácidos que se presentan de forma natural, obteniéndose 20 nuevas secuencias de prueba. Esto se repite para cada posición del dodecapéptido, obteniéndose $20 * 12 = 240$ secuencias de prueba. Entre estas 240 secuencias de prueba, el dodecapéptido original está presente 12 veces. Este procedimiento se repite para cada dodecapéptido elegido. Por tanto se obtiene una nueva biblioteca que comprende 240 a 3600 nuevas secuencias de prueba.

Se pueden realizar pruebas más complejas de este análisis de sustitución, p. ej. haciendo que nuevos bloques de construcción sean sustituidos por grupos de bloques de construcción (p. ej. la sustitución de un aminoácido por dos o más aminoácidos). Por lo general, dicha sustitución por bloques de construcción múltiples se hará con moderación. De preferencia, en al menos un análisis de sustitución de los diferentes ciclos del presente método, se sustituye al menos un bloque de construcción por un grupo de bloques de construcción. Habrá que tener cuidado para que en cada análisis de sustitución no se introduzcan demasiados bloques de construcción múltiples ya que de otro modo pueden surgir problemas relativos a la construcción de la secuencia. Por igual motivo, el grupo de bloques de construcción múltiple no será demasiado largo, de preferencia.

El experto en la materia, sobre la base de su experiencia en el campo, podrá decidir el tamaño y el número de bloques de construcción múltiples que se pueden introducir.

Es también posible sustituir un bloque de construcción por un hueco en el análisis de sustitución. Así, la secuencia tendrá un bloque de construcción menos. Es evidente que no se pueden sustituir demasiados bloques de construcción por un hueco al mismo tiempo ya que esto daría como resultado una secuencia de prueba demasiado corta o ninguna. El experto podrá decidir cuándo y en que posición resulta útil introducir un hueco en una secuencia de prueba.

Además, es posible permitir únicamente la introducción de bloques de construcción elegidos en el análisis de sustitución, o sustituir únicamente bloques de construcción en posiciones elegidas en las secuencias de prueba. Algunas veces se prefiere mantener ciertos bloques de construcción en ciertas posiciones, p. ej. a fin de mantener una estructura tridimensional deseada de la secuencia de prueba. Una ventaja de esta forma de realizar el análisis de sustitución es que el número total de secuencias de prueba que se obtiene es limitado. Por lo general sin embargo si los bloques de construcción en todas las posiciones de la secuencia de prueba se sustituyen por todos los bloques de construcción posibles, se obtendrán también las secuencias de prueba que tiene la estructura tridimensional deseada. Será, nuevamente, el experto en la materia el que decida en qué casos puede resultar útil realizar una sustitución en posiciones elegidas únicamente. También estará en condiciones de decidir en qué posiciones se puede realizar y que bloques de construcción pueden usarse para la sustitución y qué bloques de construcción pueden, de preferencia, dejarse sin usar en la sustitución (en ciertas posiciones).

Se comprueba la actividad respecto del receptor de las secuencias de prueba de la próxima biblioteca obtenida sobre la base del análisis de sustitución de la, al menos una, secuencia de prueba identificada. En el caso de que entre las secuencias de prueba de esta biblioteca se encuentre presente una secuencia de prueba que presente una actividad

suficiente respecto del receptor, el método se completa y se obtiene la secuencia de mimotopo deseada. Es evidente que dependerá del tipo de actividad, del receptor, de la secuencia de mimotopo y de la aplicación objetiva de la secuencia de mimotopo para considerar si cierta actividad es suficiente. Dadas las circunstancias, el experto podrá elegir un umbral para una actividad deseada.

En el caso de que ninguna de las secuencias de prueba muestre una actividad suficiente respecto del receptor, se realizará otro ciclo. Según la invención, se realizan de preferencia al menos dos ciclos y por tanto dos análisis de sustitución. Por lo tanto, se proporciona otra biblioteca de secuencias de prueba, basadas en las 10 a 15 secuencias de prueba de la biblioteca anterior que mostraron la actividad máxima tal como se ha indicado anteriormente. Las secuencias de prueba en esta nueva biblioteca se evaluarán para determinar su actividad, y así sucesivamente.

El número de ciclos que se tiene que realizar dependerá del grado deseado de actividad de la secuencia de mimotopo a encontrar para el receptor. Partiendo de aprox. 4500 dodecapéptidos elegidos aleatoriamente, se ha comprobado que es posible llegar a la secuencia de epítipo exacta para un anticuerpo monoclonal en menos de tres ciclos.

En una realización preferida de la invención, la cantidad de receptor utilizada para determinar la actividad de las secuencias de prueba respecto de dicho receptor, se reduce en cada ciclo. Se ha comprobado que los bloques de construcción que parecen ser esenciales en el primer ciclo pueden no serlo en los ciclos siguientes. En otras palabras, en dicho primer ciclo se pueden encontrar óptimos locales que pueden resultar superados en un ciclo ulterior o en ciclos ulteriores. La reducción de la cantidad de receptor en la determinación de la actividad de las secuencias de prueba contribuye, como se ha visto, a superar estos óptimos locales. De preferencia, la cantidad de receptor utilizada en la determinación de las actividades de secuencias de prueba en una biblioteca se reduce en un factor de 50 a 1000, de preferencia de 10 a 100.

La invención se aclarará ahora a la vista de los siguientes ejemplos no restrictivos.

Ejemplos

Los ejemplos descritos ilustran seis variaciones del presente método de optimización que se ha aplicado con éxito a péptidos "lead", identificados con anticuerpos (monoclonales y policlonales) cultivados con péptidos, proteínas, virus, bacterias, azúcares y esteroides de vario tipos de bibliotecas de repetidos. Se puede pensar que son posibles otras variaciones. El concepto que rige estas variaciones es la repetición de los análisis de sustitución en uno o más péptidos "lead". Se superan los mínimos locales y se identifican epítopes y mimotopos.

Materiales y métodos

Síntesis y examen de bibliotecas mini tarjeta (utilizado en los ej. 1, 2, 5, 6)

Utilizando los 20 aminoácidos L naturales se generaron 4550 dodecapéptidos aleatorios (12-meros) con un generador aleatorio programado en Quick Basic utilizado en un sistema informático 486 DX2 (66 MHz). En esta biblioteca la frecuencia de cada residuo es de aprox. 5%. Este conjunto de secuencias se utilizó para diseñar bibliotecas adicionales. Una en la que todas las secuencias están en forma de D-aminoácido, una en la que la 2ª y 11ª posición están ocupadas por una cisteína y una en la que la 3ª y 10ª posición están ocupadas por una cisteína. La finalidad de las dos últimas es introducir un puente disulfuro en el péptido que presentará los péptidos como bucles. Es muy importante aquí que la secuencia de los aminoácidos dentro y fuera de las cisteínas sea idéntica a la del primer conjunto de 450 dodecapéptidos. Así, la actividad de estos conjuntos de dodecapéptidos puede compararse. El ej. 1 describe resultados obtenidos con la biblioteca de péptidos sintética, en la que las posiciones 3ª y 10ª están ocupadas por una cisterna.

El ej. 2 describe los resultados obtenidos con una biblioteca de péptidos sintética compuesta por 4550 dodecapéptidos aleatorios (12-meros), es decir que no se utilizó ninguna cisteína ni otro motivo.

Las bibliotecas se sintetizaron con y detectaron utilizando tarjetas mini-PEPSCAN de formato tarjeta de crédito (455 péptidos/tarjeta) según lo antes descrito (Slooststra *et al.*, 1995b). En el ej. 1, la fijación del anticuerpo monoclonal 26/9 a cada péptido se probó en un inmunoensayo ligado a enzima basado en PEPSCAN (ELISA). El anticuerpo monoclonal 26/9 se ha descrito anteriormente (Wilson *et al.*, 1984; Rini *et al.*, 1992; Churchill *et al.*, 1994). Se cultivó anticuerpo monoclonal 26/9 con el péptido HA175-110 de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (X47: HA1) (Wilson *et al.*, 1984).

En el ej. 1 se incubaron las tarjetas de polietileno de formato tarjeta de crédito de 455 pocillos, que contenían los péptidos ligados de forma covalente con anticuerpo 26/9 (100 µg/ml). Después de lavar los péptidos se incubaron peroxidasa antiraton-conejo (rampo dilución 1/1000) (Dakopats) (1 h, 25°C) y ulteriormente después de lavar el sustrato de peroxidasa se añadió 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato (ABTS) y 2 µl/ml 3% H₂O₂. Al cabo de una hora, se midió el desarrollo del color. El desarrollo del color de ELISA se cuantificó con una cámara CCD y un sistema de

procesamiento de imagen. La configuración consiste en una cámara CCD y una lente de 55 mm (Sony CCD Vídeo cámara XC-77RR, Nikon micronikkor 55 mm lente f/2,8) un adaptador de cámara (Sony Cámara adaptor DC-77RR) y el software de procesamiento de imagen TIM, versión 3.36 (Difa Measuring Systems, Países Bajos) que funciona en un sistema informático 486 DX2 (50 MHz).

La biblioteca de dodecapéptidos, compuesta por 4550 dodecapéptidos aleatorios, se examina con una concentración relativamente elevada de anticuerpo (100 $\mu\text{g/ml}$, mejor 10 $\mu\text{g/ml}$, ver ej. 2-6). Esta concentración es aprox. 2 orden de magnitud por encima de la concentración requerida para obtener una fijación de actividad máxima en ELISA con péptido epítipo nativo (no mostrado). La concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se utilizó para obtener muchos repetidos de fijación del pequeño conjunto de 4550 dodecapéptidos aleatorios. En estudios previos se ha mostrado que esta estrategia, sin obtener un ratio desfavorable señal/ruido, puede dar como resultado centenares de péptidos de fijación que se parecen a partes pequeñas lineales o no lineales del epítipo nativo (Slootstra *et al.*, 1995b; Slootstra *et al.*, 1997).

Síntesis y examen de OTRAS bibliotecas pepscan (utilizado en el ej. 4)

Además de las bibliotecas minipepscan aleatorias los mimotopos se pueden identificar también a partir de bibliotecas pepscan standard. Estas bibliotecas contienen los 12-meros de superposición (o más cortos/más largos) que cubren la secuencia lineal de una proteína conocida (Slootstra *et al.*, 1995a).

Síntesis y examen de bibliotecas no pepscan (utilizados en los ej. 3, 6)

Los péptidos “lead” se pueden derivar también de otro tipo de bibliotecas, como p. ej. de expresión en fago.

Análisis de secuencia de moléculas “lead” (utilizado en el ej. 5)

Se clasificaron los 4550 dodecapéptidos según su actividad de fijación. Según su clasificación se identificaron secuencias de consenso y motivos. Se han descrito métodos iniciales de optimización “lead” que utilizan solamente la secuencia de las 50 moléculas superiores, en Slootstra *et al.* (1995b; 1997). El presente método utiliza la totalidad de las 4550 secuencias. En primer lugar, la frecuencia y/o distribución de aminoácidos individuales y los motivos de dipéptido OO motivos de dipéptido OXO y motivos de dipéptido OXXO se determina utilizando Microsoft Excel 4.0 (O, uno de los 20 aminoácidos L naturales X, cualquier residuo). En segundo lugar se incluyen en el análisis propiedades de los aminoácidos (carácter hidrófobo, carga, etc.). En tercer lugar todos estos datos se utilizan para optimizar la actividad de las 10-50 moléculas “lead” superiores. Esto se hace sustituyendo bloques de construcción que inhiben la actividad e incluyen bloques de construcción que mejoran la actividad de fijación.

El presente método de análisis de secuencia mejora la actividad de moléculas “lead” mediante análisis de todas las partes en las secuencias de la biblioteca.

Análisis de sustitución (utilizados en los ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6)

En un análisis de sustitución se investiga de forma detallada la actividad de fijación de series completas de análogos de sustitución de péptidos “lead”, donde cada posición se sustituye por cada uno de los demás 19 aminoácidos L naturales. Además, es posible utilizar los 20 aminoácidos D así como otros aminoácidos no naturales disponibles. Las sustituciones que mejoran la fijación se combinan en nuevas secuencias de bloques de construcción. Estas nuevas secuencias se vuelven a probar en un segundo análisis de sustitución. Se realizarán más rondas de análisis de sustitución si es preciso. Tras cada ronda de análisis de sustitución la concentración de anticuerpos (o de otro receptor soluble) se puede reducir para obtener una actividad de sustitución máxima (p. ej. de 100 $\mu\text{g/ml}$ a 0,01 $\mu\text{g/ml}$ después de dos rondas de análisis de sustitución, tal como se muestra en el ej. 1).

Referencias

- Churchill M. E. A., Stura E. A., Pinilla C., Appel J. R., Houghten R. A., Kono D. H., Balderas R. S., Fieser G. G., Schulze-Gahmen U. and Wilson I. A. (1994). Crystal structure of a peptide complex of anti-influenza peptide antibody Fab 26/9. *J. Mol. Biol.* 241, 534-556.

- Rini J. M., Schulze-Gahmen U. and Wilson I. A. (1992). Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen interaction. *Science*, 255, 959-965.

- Slootstra J. W., De Geus P., Haas H., Verrips, C. T. and Meloen R. H. (1995a). Possible active site of the sweet-tasting protein thaumatin. *Chemical Senses*, 20, 535-543.

- **Slootstra J. W., Puijk W. C., Ligtoet G. J., Langeveld J. P. M. and Meloen R. H. (1995b).** Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. *Molecular Diversity* 1, 87-96.

5 - **Slootstra J. W., Kuperus D., Plückthun, A. and Meloen R. H. (1996).** Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5. *Molecular Diversity* 2, 156-164.

10 - **Slootstra J. W., Puijk W. C., Ligtoet G. J., Kuperus D., W. M. M. Schaaper and Meloen R. H. (1997).** Screening of a small set of random peptides: A new strategy to identify peptides that mimic epitopes. *J. Mol. Recog.* 10, 219-224.

15 - **Wilson I. A., Niman H. L., Houghten R. A., Cherenson A.R., Connolly M. L. and Lerner R. A. (1984).** The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell*, 37, 767-778.

Notas a los ejemplos:

20 - los 10 µg/ml, 1 µg/ml etc. indican la concentración de anticuerpos.

- la línea “posición-0,1 mejorada” etc. significa que este cambio de aminoácido (subrayar) mejora la actividad de fijación en pepscan elisa con una concentración de anticuerpos dada. Las posiciones que no pueden mejorar no se mencionan (p. ej. posición -08 en la primera red de sustitución del ej. 1, es decir el original I en la posición 8 da la actividad máxima).

Ejemplo 1

30 **Título:** Identificación de un epítipo por medio de un péptido “lead” elegido de entre 4550 dodecapéptidos aleatorios (biblioteca minipeptscan con motivo XXCXXXXXXXXCXX, X aminoácido elegido aleatoriamente, ver Materiales y Método).

Herramientas: péptido “lead” CGCAAMNIRCYA.

35 **Metodología:** dos rondas de análisis de sustitución .

Resultados

40 En el ej. 1, el péptido “lead” CGCAAMNIRCYA se derivó (con anticuerpo 26/9) de la biblioteca aleatoria en la que la 3ª y 10ª a posición están ocupadas por una cisteína (ver más arriba en Materiales y Métodos). Todos los posibles análogos de sustitución individuales del péptido aleatorio CGCAAMNIRCYA probado en pepscan para determinar la fijación de anticuerpo 26/9 en 100 µg/ml. Estos resultados se describen más abajo en detalle.

45 El análisis de sustitución del péptido “lead” CGCAAMNIRCYA dio como resultado la identificación de bloques de construcción que no se pueden sustituir por otros bloques de construcción (p. ej. Y y A), y la identificación de residuos que se pueden sustituir por uno o dos bloques de construcción (p. ej. N) y residuos que se pueden sustituir por muchos otros bloques de construcción (p. ej. M). Algunas sustituciones mejoran considerablemente la actividad de fijación (p. ej. N en D).

50 Todas estas sustituciones se utilizaron para diseñar el péptido mejorado EMDEEEDIMNYA. Hay que señalar que este péptido fija anticuerpo 26/9 a una concentración muy inferior, o sea que ha mejorado la actividad de fijación (100 µg/ml para CGCAAMNIRCYA y 1,0 µg/ml para EMDEEEDIMNYA).

55 El péptido EMDEEEDIMNYA se sometió a un segundo análisis de sustitución. Se puede observar otra vez que algunas sustituciones mejoran considerablemente la actividad de fijación. Estas sustituciones se utilizaron para diseñar el péptido mejorado EMDEEEDVDPYA. Lo esencial es que la primera parte de EMDEEEDIMNYA, EMDEEE, no contiene residuos críticos mientras que la última, DIMNYA, sí lo hace. La combinación de los residuos mejorados en esta última parte da como resultado la secuencia DVPDYA. La secuencia DVPDYA es idéntica al epítipo lineal del anticuerpo 26/9. Por tanto, el péptido “lead” CGCAAMNIRCYA derivado de unos pocos millares de dodecapéptidos aleatorios se convirtió en una secuencia de epítipo nativo a lo largo de los análisis de sustitución.

ES 2 312 218 T3

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - I

5	Lead original:	CGCAAMNIRCYA	Actividad en $\geq 100,0 \mu\text{g/ml}$
	Posición mejorada-01:	EGCAAMNIRCYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
10	Posición mejorada-02:	CMCAAMNIRCYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
	Posición mejorada-03:	CGDAAMNIRCYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
15	Posición mejorada-04:	CGCEAMNIRCYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
20	Posición mejorada-05:	CGCAEMNIRCYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
	Posición mejorada-06:	CGCAAENIRCYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
25	Posición mejorada-07:	CGCAAMD [~] IRCYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
30	Posición mejorada-09:	CGCAANINIM [~] CYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
35	Posición mejorada-10:	CGCAAMNIRN [~] YA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
	Combinación mejoras:	EMDEEEDIM [~] NYA	Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
40			

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - II

45	Combinaciones Anal.- Sut I:	EMDEEEDIMNYA	Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
	Posición mejorada-08:	EMDEEEDVMNYA	Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
50			
55			
60			
65			

ES 2 312 218 T3

Posición mejorada-09: EMDEEEDIPNYA
Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada-10: EMDEEEDIMDYA
Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: EMDEEEDVPDYA
Actividad en $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

NOTA: la secuencia DVPDYA es el epítipo original. El péptido EMDEEEDVPDYA tiene una afinidad de fijación mejorada 10 veces (en solución) respecto del péptido Epítipo nativo YPYDVDPDYASLRS.

Ejemplo 2

Título: identificación de un mimotopo mediante un péptido lead seleccionado a partir de 4550 dodecapéptidos aleatorios (biblioteca minipepscan aleatoria).

Herramientas: péptido lead ANWPSAGAFGL.

Metodología: Rondas de análisis de sustitución.

Resultados

En el ej. 2, se identificaron péptidos lead a través de una biblioteca minipepscan aleatoria. La diferencia del ej. 2 respecto del ej. 1 es que el anticuerpo utilizado en el ej. 1 fija un epítipo lineal mientras que el anticuerpo utilizado en el ejemplo 2 fija un epítipo no lineal. Los siguientes análisis de sustitución múltiples se realizaron en la forma indicada en el ej. 1. El mimotopo identificado no se parece a ninguna región de la secuencia lineal de la proteína nativa.

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - I

Lead original: ANWPSAIGAFGL
Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada-01: HNWPSAIGAFGL
Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada-02: AWWPSAIGAFGL
Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada-03: ANAPSAIGAFGL

ES 2 312 218 T3

Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-04: ANWSSAIGAFGL
 Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-11: ANWSSAIGAFKL
 Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
 Combinación mejoras: HWASSAIGAFKL
 Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
 ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN-II
 Combinación An.-sust.I HWASSIGAFKL
 Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-01: KWASSAIGAFKL
 Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-02: KYASSAIGAFKL
 Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-03: WWGSSAIGAFKL
 Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-07: KWASSAMGAFKL
 Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
 Combinación mejoras: KYGSSAMGAFKL
 Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
 ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - III
 Combinaciones an.-sust.II: KYGSSAMGAFKL
 Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-03: KYFSSAMGAFKL
 Actividad en $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
 Posición mejorada-06: KYGSSGAMGAFKL
 Actividad en $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
 Combinación mejoras: KYGSSGMGAFKL
 Actividad en $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

Ejemplo 3

Título: Identificación de un mimotopo a través de “lead” derivado de una biblioteca de expresión en fago compuesta por $> 1.000.000$ de hexapéptidos aleatorios.

Herramientas: péptido “lead” SDTRKG*.

Metodología: Alargamiento hacia la izquierda y la derecha de SDTRKG con cisteinas/glicinas seguidos de tres rondas de análisis de sustitución.

ES 2 312 218 T3

Resultados

En el ej. 3, se identificaron péptidos “lead” por medio de expresión en fago. Se añadieron cisteinas/glicinas adyacentes para mejorar la actividad de fijación. Tras obtener la actividad se realizaron múltiples análisis de sustitución en la forma indicada en el ej. 1.

Alargamiento mediante cisteinas/glicinas

“Lead” expresión en fago: SDTRKG
Ninguna actividad en 10,0 µg/ml
Lead alargado: CSDTRKGCG
Actividad en ≥ 10,0 µg/ml
Lead alargado: CSDTRKGCG
Actividad en ≥ 10,0 µg/ml

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN I

Lead alargado: CSDTRKGCG
Actividad en ≥ 10,0 µg/ml
Posición mejorada 02: CTDTRKGCG
Actividad en ≥ 5,0 µg/ml
Posición mejorada 03: CSETRKGCG
Actividad en ≥ 5,0 µg/ml
Posición mejorada 05: CSDTHKGCG
Actividad en ≥ 5,0 µg/ml
Posición mejorada 06: CSDTRYGCG
Actividad en ≥ 5,0 µg/ml
Combinación mejoras: CTETHYGCG
Actividad en ≥ 1,0 µg/ml

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN II

Combinación an.-sust.I: CTETHYGCG
Actividad en ≥ 10,0 µg/ml
Posición mejorada 02: CYETHYGCG
Actividad en ≥ 0,5 µg/ml
Posición mejorada 05: CTETKYGCG
Actividad en ≥ 0,5 µg/ml

ES 2 312 218 T3

Posición mejorada 06: CTETHFGCG

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: CYETKFGCG

Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN-III

Combinación an.-sust.II: CYETKFGCG

Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 01: DYETKFGCG

Actividad en $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 08: CYETKFGNG

Actividad en $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: DYETKFGNG

Actividad en $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

* Este péptido lead es un péptido sintético, no activo (no en ELISA (pepscan o standard ni en solución). Esto no es lo único. Muchas veces los péptidos-Fago sólo son activos como parte de la proteína revestimiento-fago. En otros formatos pierden su actividad.

Ejemplo 4

Título: Identificación de un mimotopo a través de un lead derivado de un análisis pepsan standard.

Herramienta: Péptido lead RVMIKLILVNFR* y secuencia completa de proteína nativa (la parte que se utilizó en KIYRNMIKLILVNFRMQP).

Metodología: Dos rondas de análisis de sustitución, seguido de alargamiento a la izquierda y a la derecha, seguido nuevamente de dos rondas más de análisis de sustitución, finalmente seguido de alargamiento hasta un mimotopo 18-mero.

Resultado

En el ej. 4 se identificó un péptido lead por medio de análisis pepsan standard, es decir el anticuerpo se probó sobre los 12-meros superpuestos que cubren la secuencia lineal de la proteína. Las dos rondas siguientes de análisis de sustitución se realizaron en la forma indicada en el ej. 1. Además, el mimotopo se alargó a la izquierda y a la derecha (3 aminoácidos, se puede seguir alargando, mediante análisis de sustitución adicional.

ES 2 312 218 T3

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - I

Lead original: RVMIKLILVNFR
 Actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 01: AVMIKLILVNFR
 Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 02: AIMIKLILVNFR
 Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 03: AVPIKLILVNFR
 Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 08: AVMIKLIRVNFR
 Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 11: AVMIKLILVNNYR
 Actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: AIPIKLIRVNNYR
 Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCION - II

Combinación an.-sust.I: AIPKILIRVNYR
 Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 01: YIPIKLIRVNYR
 Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 02: APPIKLIRVNYR
 Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: YPPIKLIRVNYR
 Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

LONGITUD CONSECUCENCIA NATIVA:

Combinación an.-sust. II: YPPIKLIRVNFR
 Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

Alargado izquierda: KIYYPPIKLIRV
 Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

Alargado derecha: IKLIRVNYRMQP
 Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - III de péptido alargado izquierda.

Alargado izquierda: KIYYPPIKLIRV

ES 2 312 218 T3

Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$ izquierda

Posición mejorada 01: RIYYPPIKLIRV

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 02: KPYYPPIKLIRV

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 03: KIWYPPIKLIRV

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 08: KIYYPPIKLIRV

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: RPWYPPISLIRV

Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - IV de péptido alargado derecho

Alargado derecha: IKLIRVNYRMQP

Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 10: IKLIRVNYRCQP

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 11: IKLIRVNYRMEP

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 12: IKLIRVNYRMQN

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: IKLIRVNYRCEN

Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

Combinación total: RPWYPPISLIRVNYRCEN

Actividad en $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

* El péptido lead se identificó a partir de una biblioteca compuesta por todos 12-meros superpuestos que cubren la secuencia lineal de una proteína. Esto permite alargar el péptido a la izquierda y a la derecha con aminoácidos adyacentes; en este caso KIY a la izquierda y MQP a la derecha. Los análisis de sustitución adicionales de 12-meros, movidos 3 a la izquierda y 3 a la derecha de la secuencia da como resultado final un mimotopo 18-mero.

Ejemplo 5

Título: identificación de un mimotopo mediante un conjunto de “leads” similares elegidos de 4550 dodecapéptidos aleatorios (biblioteca minipepscan aleatoria).

Herramientas: conjunto de 6 péptidos lead QNNMKLFRGCV, RGIKWNEMTDQW, KLQQNPTFYPPV, TNNC-KEFAGIVP, RGILTNIMKDQW, IVQNNPKFFRGA (potencialmente hasta todos los 4550 péptidos, véase material y métodos, en este caso también se quitan de los “leads” los aminoácidos “negativos”).

ES 2 312 218 T3

Metodología: Determinación de secuencia de consenso seguida de dos rondas de análisis de sustitución de la secuencia de consenso.

5 *Resultado*

En el ej. 5, se utilizó un conjunto de péptidos “leads” similares para identificar una secuencia de consenso. Las secuencias de consenso se identificaron en la forma indicada en materiales y métodos. Esta secuencia se utilizó en los análisis de sustitución.

Alineamiento de péptidos “LEAD”

QNNMKLFRGCVF

RGIKWNWMTDQW

KLQONPTFYPPV

TNNCKEFAGIVP

RGILTNIMKDQW

IVQNNPKFFRGA

Consenso: ILONNMKDFRG

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN I

Lead de consenso: ILONNMKDFRG

Actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 03: ILTNNMKDFRG

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 07: ILQNNMPDFRG

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 10: ILQNNMKDWRG

Actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: ILTNNMPDWRG

Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - II

Combinación an.sust. I: ILTNNMPDWRG

Actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 07: ILTNNMGDWRG

Actividad en $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$

Posición mejorada 11: ILTNNMPDWYG

Actividad en $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$

Combinación mejoras: ILTNNMGDWYG

Actividad en $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

Ejemplo 6

Título: identificación de mimotopo mediante un conjunto de “leads” diferentes elegidos de una biblioteca de expresión en fago compuesta por > 1.000.000 de hexapéptidos aleatorios.

Herramientas: conjunto de 3 péptidos “lead” (ANWPSA, KLITRW, NVCSWS).

Metodología: Dos rondas de análisis de sustitución (para cada péptido leads), seguido de determinación de secuencia consenso global.

Resultados

En el ej. 6 se utilizaron péptidos leads diferentes para identificar una secuencia de consenso. Cada péptido leads se utilizó en análisis de sustitución múltiples (dos rondas). Los tres mimotopos resultantes se alinearon dando como resultado un mimotopo alargado con actividad mejorada.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 312 218 T3

ANÁLISIS DE SUSTITUCION-IA

Lead original:	ANWPSA	actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 01:	<u>H</u> NWPSA:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 02:	A <u>W</u> WPSA:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 03:	AN <u>A</u> PSA:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 04:	ANW <u>S</u> SA:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Combinación mejoras:	<u>H</u> <u>W</u> A <u>S</u> SA:	actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - IIA

Comb. An.sust. IA:	HWASSA:	actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 05:	HWAS <u>P</u> A:	actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
Combinación mejoras:	HWAS <u>P</u> A:	actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCION -IB

Lead original:	KLITRW:	actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 01:	<u>S</u> LITRW:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 02:	K <u>S</u> ITRW	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 03:	KL <u>A</u> TRW:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 06:	KLIT <u>R</u> Y:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Combinación mejoras:	<u>S</u> <u>S</u> AT <u>R</u> Y:	actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - IIB

Comb. An.sust. IA:	SSATRY:	actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 05:	<u>S</u> PATRY:	actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
Combinación mejoras:	<u>S</u> PATRY:	actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCION -IC

Lead original:	NVCSWS:	actividad en $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 02:	N <u>I</u> CSWS:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 04:	NV <u>C</u> HWS:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 06:	NVCS <u>W</u> A:	actividad en $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
Combinación mejoras:	N <u>I</u> <u>C</u> H <u>W</u> A:	actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN - IIC

Comb. An.sust. IC:	NICHWA:	actividad en $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 01:	<u>Y</u> ICHWA:	actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
Posición mejorada 02:	N <u>V</u> CHWA:	actividad en $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
Combinación mejoras:	<u>Y</u> <u>V</u> CHWA	actividad en $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

ALINEACIÓN COMBINACIÓN MEJORAS: IIA, IIB y IIC

Combinación mejoras 1:	HWASPA
Combinación mejoras 2:	SPATRY
Combinación mejoras 3:	YVCHWA

Consenso: YVCHASSATRY

actividad en $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar una secuencia mimotopo para un receptor que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una biblioteca de secuencias de prueba compuesta por bloques de construcción elegidos dentro del grupo de los aminoácidos, monosacáridos y nucleótidos;

b) determinar la actividad de cada secuencia de prueba de la biblioteca respecto del receptor;

c) identificar una secuencia de prueba que contiene en cierta posición un bloque de construcción, que, según los resultados de la etapa b, muestra una actividad de fijación respecto del receptor;

d) obtener otra biblioteca de secuencias de prueba, basada en la secuencia de prueba identificada en la etapa c, sustituyendo un bloque de construcción en posiciones elegidas de la secuencia de prueba identificada, por bloques de construcción elegidos;

e) determinar la actividad de cada secuencia de prueba de la biblioteca obtenida en la etapa d) respecto del receptor;

f) identificar una secuencia de prueba que contiene en cierta posición un bloque de construcción que, según los resultados de la etapa e), muestra una actividad de fijación respecto del receptor;

g) repetir las etapas de d)-f) para la biblioteca de secuencias de prueba obtenida en la etapa d), durante cierto número de ciclos hasta que se encuentra en la etapa f) una secuencia mimotopo que presenta una actividad de umbral respecto del receptor, reduciéndose en cada ciclo la cantidad de receptor utilizado para determinar la actividad de las secuencias de prueba respecto de dicho receptor; cada secuencia de prueba se sitúa en una mini tarjeta o medio de soporte plano.

2. Método según la reivindicación 1, donde la composición química de las secuencias de prueba proporcionadas en la etapa A es conocida.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, donde en la etapa e) la cantidad de receptor utilizada para determinar la actividad es de 50 a 1000 veces menor que la cantidad utilizada en la etapa b) y donde dicha cantidad en la etapa g) es de 50 a 1000 veces menor que la cantidad en la etapa e) del ciclo que precede directamente la etapa g) mencionada.

4. Método según la reivindicación 3, donde en la etapa e) la cantidad de receptor utilizada para determinar la actividad es de 100 a 100 veces menor que la cantidad utilizada en la etapa b) y donde dicha cantidad en la etapa g) es de 10 a 100 veces menor que la cantidad en la etapa e) del ciclo que precede directamente la etapa g) mencionada.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende por lo menos una etapa d) en la que al menos un bloque de construcción se sustituye por un grupo de bloques de construcción.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las secuencias de prueba comprenden de 3 a 20 bloques de construcción.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la biblioteca de secuencias de prueba de la etapa a) comprende de 500 a 100.000 secuencias de prueba.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el receptor se elige dentro del grupo formado por anticuerpos monoclonales, proteínas, como enzimas, células, receptores de hormonas y microorganismos.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la actividad se determina utilizando un inmunoensayo, BIACORE o AFM.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada secuencia de prueba de una biblioteca se separa físicamente de las demás secuencias de prueba de dicha biblioteca.