



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0513155-3 B1



(22) Data do Depósito: 06/07/2005

(45) Data de Concessão: 20/07/2021

(54) Título: MÉTODO DE DISTINGUIR UM OU MAIS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO FUNCIONAIS DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO NÃO-FUNCIONAIS EM UMA REGIÃO DEFINIDA DENTRO DE UM POLIPEPTÍDEO, MÉTODO DE GERAR UMA BIBLIOTECA DE ANÁLOGOS DE POLIPEPTÍDEO E MÉTODO DE IDENTIFICAR UM SUBCONJUNTO DE ANÁLOGOS DE POLIPEPTÍDEO TENDO UMA PROPRIEDADE DESEJADA

(51) Int.Cl.: C07H 21/02; C07K 16/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/07/2004 US 60/585,918.

(73) Titular(es): BIOREN, INC..

(72) Inventor(es): ROBERTO CREA.

(86) Pedido PCT: PCT US2005024140 de 06/07/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/023144 de 02/03/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/01/2007

(57) Resumo: MUTAGÊNESE POR INSERÇÃO PARA DESENVOLVER POLIPEPTÍDEOS ALTERADOS COM PROPRIEDADES REALÇADAS. Um método de mutagênese pelo qual um aminoácido predeterminado é introduzido em cada e toda posição de um conjunto selecionado de posições em uma região pré selecionada (ou várias regiões diferentes) de um polipeptídeo para produzir uma biblioteca de análogos de polipeptídeo é divulgado. O método é fundamentado no local que certos aminoácidos desempenham um papel crucial na estrutura e função das proteínas e assim é capaz de identificar e distinguir os resíduos de aminoácido funcionais ("zonas quentes") de resíduos de aminoácidos não funcionais ("zonas frias") dentro de um polipeptídeo ou porção deste. As bibliotecas podem ser geradas que contêm apenas análogos de polipeptídeo desejados e são de tamanho razoável para a triagem. As bibliotecas podem ser usadas para estudar o papel de aminoácidos específicos na estrutura e função do polipeptídeo e para desenvolver polipeptídeos novos ou melhorados tais como anticorpos, fragmentos de anticorpo, anticorpos de cadeia simples, enzimas, e ligandos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO DE DISTINGUIR UM OU MAIS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO FUNCIONAIS DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO NÃO-FUNCIONAIS EM UMA REGIÃO DEFINIDA DENTRO DE UM POLIPEPTÍDEO, MÉTODO DE GERAR UMA BIBLIOTECA DE ANÁLOGOS DE POLIPEPTÍDEO E MÉTODO DE IDENTIFICAR UM SUBCONJUNTO DE ANÁLOGOS DE POLIPEPTÍDEO TENDO UMA PROPRIEDADE DESEJADA"**.

Informação Relacionada

[0001] A presente invenção refere-se a conteúdos totais de todas as outras patentes, pedidos de patente, e referências citadas por todo o relatório descritivo seguinte também são incorporados por referência aqui em suas totalidades.

Antecedentes da Invenção

[0002] A mutagênese é uma ferramenta poderosa no estudo da estrutura e função da proteína. As mutações podem ser feitas na sequência de nucleotídeo de um gene clonado que codifica uma proteína de interesse e o gene modificado pode ser expressado para produzir mutantes da proteína. Comparando-se as propriedades de uma proteína do tipo selvagem e os mutantes gerados, é frequentemente possível identificar os aminoácidos individuais ou domínios de aminoácidos que são essenciais para a integridade estrutural e/ou função bioquímica da proteína, tal como sua atividade de ligação e/ou catalítica. O número de mutantes que podem ser gerados a partir de uma única proteína, entretanto, torna difícil selecionar os mutantes que serão informativos ou têm uma propriedade desejada, mesmo se os mutantes selecionados que abrangem as mutações estiverem somente em regiões putativamente importantes de uma proteína (por exemplo, regiões que preparam um sítio ativo de uma proteína). Por exemplo, a substituição, a supressão, ou a inserção de um aminoácido particular

podem ter um efeito local ou global na proteína.

[0003] Os métodos anteriores para mutagenizar os polipeptídeos foram muito restritivos, muito inclusivo, ou limitados para tornar inoperante a função da proteína ao invés de aumentar ou melhorar a função. Por exemplo, um método altamente restritivo é seletivo ou mutagênese dirigida ao sítio que é usada para identificar a presença de um sítio funcional particular ou entender as consequências de fazer uma alteração muito específica dentro do sítio funcional. Uma aplicação comum da mutagênese dirigida ao sítio está no estudo das fosfoproteínas onde um resíduo de aminoácido, que comumente seria fosforilado e permitiria que o polipeptídeo realizasse sua função, é alterada para confirmar a ligação entre a fosforilação e a atividade funcional. Este método é muito específico para o polipeptídeo e resíduo que é estudado.

[0004] Reciprocamente, um método altamente inclusivo é a mutagênese por saturação ou aleatória que é designada a produzir um número grande de mutações abrangendo todas as alterações possíveis dentro de uma região definida de um gene ou proteína. Isto é fundamentado no princípio de que, gerando-se essencialmente todas as variantes possíveis de um domínio de proteína relevante, o arranjo próprio de aminoácidos é provável a ser produzido como um dos mutantes aleatoriamente gerados. Entretanto, na prática, o número vasto de combinações aleatórias de mutações geradas pode impedir a capacidade para selecionar significativamente um candidato desejado por causa da presença do assim chamado "ruído" de muitos candidatos indesejados.

[0005] Um outro método, referido como mutagênese por "Condução" (ver, por exemplo, Patentes U.S. Nos: 5.830.650; 5.798.208) foi usado para mutagenizar uma região definida de um polipeptídeo sintetizando-se uma mistura de oligonucleotídeos

degenerados que, estatisticamente, contêm um conjunto desejado de mutações. Entretanto, porque a síntese de polinucleotídeo degenerado é utilizada, a mutagênese por Condução produz várias alterações indesejadas além do conjunto desejado de mutações. Por exemplo, para introduzir sequencialmente uma mutação através de uma região definida de apenas cinco posições de aminoácido, um conjunto de mais de 100 polinucleotídeos deve ser fabricado (e triado) (ver, por exemplo, A figura 6). Consequentemente, para fabricar e triar, por exemplo, duas ou três regiões tornam-se crescentemente complexas, isto é, requerendo a fabricação e triagem de 200 a mais de 300 polinucleotídeos, respectivamente, quanto à presença de apenas 10 a 15 mutações.

[0006] Ainda em um outro método que foi usado para mutagenizar as proteínas é a mutagênese de varredura de alanina, onde um resíduo de alanina é "varrido" através de uma porção de uma proteína para identificar posições onde a função da proteína é interrompida. Entretanto, este método apenas considera a perda de função da proteína por via de substituir um resíduo de alanina neutro em uma posição dada, ao invés de aumento ou melhora da função. Assim, ele não é um método útil para gerar proteínas tendo estrutura e função melhoradas.

[0007] Consequentemente, uma necessidade permanece para um modo sistemático para mutagenizar uma proteína quanto à função nova ou melhorada.

Sumário da Invenção

[0008] A invenção pertence a um método de mutagênese para a geração de proteínas novas ou melhoradas (ou polipeptídeos) e às bibliotecas de análogos de polipeptídeo e polipeptídeos específicos gerados pelos métodos. O polipeptídeo alvejado para a mutagênese pode ser um polipeptídeo natural, sintético ou engendrado, incluindo

fragmentos, análogos e formas mutantes destes.

[0009] Em uma modalidade, o método compreende introduzir um aminoácido predeterminado essencialmente em cada posição dentro de uma região definida (ou várias regiões diferentes) da sequência de aminoácido de um polipeptídeo. Uma biblioteca de polipeptídeo é gerada contendo análogos de polipeptídeo que individualmente não têm mais do que um aminoácido predeterminado, mas que coletivamente têm o aminoácido predeterminado em cada posição dentro da(s) região(ões) definida(s). Exclusivamente, este método pode ser referido como mutagênese "por inserção" porque, em efeito, um único, aminoácido predeterminado (e apenas o aminoácido predeterminado) é substituído posição por posição por toda parte de uma ou mais região(ões) definida(s) de um polipeptídeo.

[0010] Entretanto, em uma modalidade preferida, o método de LTM é melhorado usando-o para identificar aminoácidos funcionais (ou assim chamadas "zonas quentes") de aminoácidos não-funcionais (ou assim chamadas "zonas frias") dentro de um polipeptídeo, ou porção deste, para reduzir ainda o número de resíduos a serem alterados de modo a triar e obter uma propriedade desejada em um polipeptídeo. Consequentemente, o método melhorado de mutagênese look-through (LTM) (daqui por diante a LTM melhorada sendo referida como LTM2) leva em consideração a identificação e construção de um subconjunto de moléculas-candidatos representando apenas as alterações funcionais mais relevantes no polipeptídeo que depois podem ser eficientemente triadas isentas de qualquer "ruído". Importaneamente, a LTM2 também leva em consideração a construção de uma biblioteca de LTM2 tendo vantagens superiores sobre as bibliotecas tradicionais porque ela foi designada a incluir apenas as alterações nos resíduos de aminoácido do polipeptídeo mais provável a ter um efeito na função do polipeptídeo e portanto, na triagem, mais provável a produzir um

polipeptídeo alterado tendo uma propriedade realçada. Assim, a LTM2 permite que uma pessoa "examine" as consequências estruturais e funcionais de substituir separadamente um aminoácido predeterminado em cada posição de aminoácido funcional dentro de uma região definida do polipeptídeo, segregando deste modo uma química de proteína específica à região definida sem qualquer interferência ou "ruído" da geração de análogos de polipeptídeo indesejados (isto é, análogos contendo substituições de aminoácido outras que não aquelas que seguem o esquema de LTM2) (ver, por exemplo, A figura 1).

[00011] Consequentemente, a presente invenção leva em consideração avaliação sistemática altamente eficiente e precisa do papel de uma mudança de aminoácido específica em uma ou mais regiões definidas de um polipeptídeo. Isto torna-se particularmente importante quando da avaliação (por mutação) de duas ou mais regiões definidas, tal que o número de análogos de polipeptídeo necessário aumenta muito e, assim, a presença de análogos indesejados também aumenta. A presente invenção obvia este problema eliminando-se completamente os análogos indesejados e, assim, o potencial que quaisquer mudanças na estrutura ou função da proteína observadas são o resultado de algo mais a substituição do aminoácido predeterminado. Assim, o efeito de segregar uma química de proteína específica a onze regiões múltiplas com uma proteína pode ser estudado com exatidão e eficiência altas. Importantemente, isto inclui estudar como a mutagênese pode afetar a interação de tais regiões, melhorando deste modo a estrutura e a função globais da proteína.

[00012] Em uma modalidade particular da invenção, os métodos da invenção são adequados para identificar um motivo químico particular que mapeia a um ou mais resíduos ou posições de aminoácido funcionais. O(s) resíduo(s) de aminoácido que contribui(em) para um tal motivo químico pode(m) ocorrer em uma ou mais posições que são

contígua, não-contígua, dentro de uma ou mais regiões de CDR, e/ou dentro de um ou mais polipeptídeos, por exemplo, cadeias de anticorpo pesadas e leves. Os métodos da invenção levam em consideração a outra exploração de um motivo químico de modo que eles levam em consideração o teste sistemático (ou perfil químico) de químicas de aminoácido relacionadas na(s) posição(ões) de aminoácido selecionada(s) ou região(ões) definida(s). Consequentemente, em uma modalidade, a invenção fornece um método para identificar uma química desejada e depois explorar as consequências da incorporação de químicas relacionadas ou não-relacionadas para obter uma propriedade realçada ou para remover uma propriedade deletéria. As químicas da cadeia lateral de aminoácido típicas adequadas para perfilar pelos métodos da invenção são químicas da cadeia lateral de aminoácido polares, positivamente carregadas, negativamente carregadas, e hidrofóbicas. Em uma modalidade, uma química carregada é identificada como residente em um resíduo, posição de aminoácido selecionados, ou região(ões) definida(s) e outros aminoácidos carregados são substituídos no lugar do aminoácido parental tal que uma alteração em uma propriedade mensurável é obtida. Em uma modalidade preferida, a alteração em uma propriedade mensurável é uma propriedade realçada em um anticorpo, por exemplo, ligação de antígeno ou função efetora melhoradas.

[00013] Consequentemente, a invenção também fornece bibliotecas de anticorpo compreendendo químicas do grupo lateral de aminoácido relacionadas introduzidas em posição (ões) de aminoácido selecionada(s)/regiões definidas tendo, por exemplo, química relacionada, para a triagem eficiente de anticorpos com propriedades melhoradas.

[00014] Em uma outra modalidade da invenção, a biblioteca de análogos de polipeptídeo é gerada e triada sintetizando-se primeiro

polinucleotídeos individuais que codificam uma região definida ou regiões de um polipeptídeo onde, coletivamente, os polinucleotídeos representam todos os polinucleotídeos variantes possíveis de acordo com os critérios de inserção descritos aqui. O método é usado para identificar e distinguir o(s) resíduo(s) de aminoácido funcional(is) (posições) do(s) resíduo(s) de aminoácido não-funcional(is) (posições). Um subconjunto de polinucleotídeos variantes é expressado, por exemplo, usando transcrição e tradução in vitro e/ou usando uma tecnologia de exibição, tal como exibição de ribossomo, exibição de fago, exibição bacteriana, exibição de levedura, exibição arranjada, ou qualquer outro sistema de exibição adequado conhecido na técnica.

[00015] Os polipeptídeos expressados depois são triados e selecionados usando ensaios funcionais, tais como ensaios de ligação ou ensaios enzimáticos/catalíticos. Em uma modalidade, os polipeptídeos são expressados em associação com o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo, deste modo levando em consideração a identificação da sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo. Ainda em uma outra modalidade, os polipeptídeos são diretamente sintetizados usando a química da proteína.

[00016] Ainda em uma outra modalidade da invenção, uma biblioteca combinatória benéfica das variações da sequência de aminoácido de CDR VL e VH é construída. Esta segunda biblioteca é construída gerando-se sequências de codificação tendo, em cada posição de variação de aminoácido, códons para o aminoácido do tipo selvagem e para cada um dos aminoácidos variantes benéficos previamente identificados nesta posição.

[00017] Assim, a presente invenção fornece um método de mutagênese inteligente que pode ser usada para gerar bibliotecas de análogos de polipeptídeo que são de um tamanho prático para a triagem, em parte, porque as bibliotecas são destituídas de quaisquer

peptídeos análogos indesejados ou o assim chamado ruído. O método pode ser usado para estudar o papel dos aminoácidos específicos na estrutura e na função do polipeptídeo e para desenvolver polipeptídeos novos ou melhorados tais como anticorpos, fragmentos de ligação ou análogos destes, anticorpos de cadeia simples, anticorpos catalíticos, enzimas e ligantes. Além disso, o método pode ser realizado com o benefício de informação a priori, por exemplo, por intermédio de modelagem por computador, que pode ser usada para selecionar um subconjunto inicial de análogos de polipeptídeo a ser produzido e estudado usando LTM2.

[00018] Outras vantagens e aspectos da presente invenção estarão facilmente evidentes a partir da descrição e Exemplos seguintes.

Breve Descrição das Figuras

[00019] A figura 1 ilustra as vantagens de LTM melhorada (LTM2) sobre LTM em que os aminoácidos funcionais são distinguidos dos aminoácidos não-funcionais tal que um subconjunto mais benéfico de moléculas-candidatas é obtido e triado.

[00020] A figura 2 ilustra um método geral para o uso da reação em cadeia de polimerase (PCR) para construir regiões definidas de uma cadeia de anticorpo pesado e leve para identificar os resíduos de aminoácido funcionais, em um contexto genético maior.

[00021] A figura 3 ilustra o arranjo de CDRs de cadeia leve variável (VL) e de cadeia pesada variável (VH) em um contexto genético anticorpo antiovalbumina sintético de cadeia simples (scFv). Na aplicação de LTM, um aminoácido de leucina é introduzido em cada um dos quatorze resíduos 56 a 69 na CDR2 de VH do anticorpo. Para a aplicação de LTM2, apenas aqueles resíduos identificados como funcionais são explorados ainda por mutagênese.

[00022] A figura 4 ilustra a reação em cadeia de polimerase de extensão por sobreposição única (SOE-PCR) para a produção de uma

biblioteca de CDR2 de VH de LTM; a produção de bibliotecas de CDR de VH de LTM múltiplas; e um arranjo de combinações de biblioteca de LTM contendo tanto CDRs de VH quanto de VL

[00023] A figura 5 ilustra a diversidade das bibliotecas da invenção com os eixos x e y da matriz representando as CDRs de cada uma das cadeias leves e pesadas em que um "0" indica uma CDR do tipo selvagem e um "1" indica uma CDR mutada e o número dividido representando a complexidade da biblioteca de subconjunto resultante (por exemplo, 4 significa que quatro CDRs são simultaneamente mutadas).

[00024] A figura 6 mostra uma esquemática de um vetor de expressão de levedura para exibir as proteínas de interesse, por exemplo, análogos de polipeptídeo da invenção, na superfície de levedura para a identificação eficiente da função (fenótipo) e sequência de codificação correspondente (genótipo).

[00025] A figura 7 representa um gráfico de Separador Celular Ativado por Fluorescência (FACS®) da ligação de ovalbumina biotilada e estreptavidina FITC ao scFv antiovalbumina do tipo selvagem (linha cinza); vetor pYD1 sozinho (área cinza sólida); e scFv de controle (linha preta).

[00026] A figura 8 representa os gráficos de Separador Celular Ativado por Fluorescência (FACS®) que mostram uma porta de seleção (o trapezóide R1) para identificar apenas aqueles clones de LTM que expressaram a fusão de scFv com uma afinidade de ligação mais alta para a ovalbumina do que o anticorpo antiovalbumina do tipo selvagem (painel esquerdo), a distribuição das afinidades de ligação da biblioteca de LTM total (painel central), e uma análise de FACS pós classificação (painel direito) para confirmar que > 80 % dos clones antiovalbumina scFv de pré triagem estavam dentro dos critérios predeterminados.

[00027] A figura 9 ilustra as etapas na triagem de anticorpos scFv

(por exemplo, antiovalbumina) formados de acordo com a presente invenção para a afinidade de ligação melhorada com base na cinética de ligação em equilíbrio (por exemplo, para ovalbumina).

[00028] A figura 10 mostra as curvas de ligação em equilíbrio para as células que expressam antiovalbumina scFv antes da seleção (círculos), depois de uma rodada de seleção (triângulos claros), depois de duas rodadas de seleção (triângulos escuros), e para o anticorpo de referência do tipo selvagem antiovalbumina (quadrados escuros).

[00029] A figura 11 ilustra as etapas típicas para a triagem de anticorpos formados de acordo com a presente invenção quanto à afinidade de ligação alta com base na cinética de ligação particular, por exemplo, constantes K_{off} de anticorpo, usando a ovalbumina de antígeno de teste.

[00030] A figura 12 mostra a identificação das propriedades realçadas em dois clones (isto é, K_{off} relativa mais alta quando comparada a um anticorpo de referência (quadrado)) usando os métodos da invenção.

[00031] A figura 13 representa as propriedades realçadas (ver duplicação melhor do que o tipo selvagem) de um subconjunto de clones melhorados tendo valores de EC_{50} mais baixos com respeito a um controle de anticorpo de referência do tipo selvagem antiovalbumina (quadrado).

[00032] A figura 14 mostra uma matriz representando as posições de aminoácido funcionais (zonas quentes) e não-funcionais (zonas frias) de um anticorpo exemplar. As mutações associadas com a afinidade realçada (em relação ao anticorpo do tipo selvagem de referência) com base nos experimentos de ligação em equilíbrio (EC_{50}) e/ou ligação cinética são mostradas abaixo de cada posição de CDR de V_H e de V_L .

Descrição Detalhada da Invenção

[00033] De modo a fornecer um entendimento claro do relatório

descritivo e reivindicações, as definições seguintes são fornecidas abaixo.

Definições

[00034] Como aqui usado o termo "análogo" refere-se a um polipeptídeo variante ou mutante (ou um ácido nucléico que codifica um tal polipeptídeo) tendo uma ou mais substituições de aminoácido.

[00035] O termo "molécula de ligação" refere-se a qualquer molécula de ligação, incluindo proteínas, polipeptídeos, e peptídeos que se ligam a um substrato ou alvo. Em uma modalidade, a molécula de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação deste (por exemplo, um fragmento Fab), anticorpo de domínio único, anticorpo de cadeia simples (por exemplo, scFv), ou peptídeo capaz de ligar um ligante. Em uma outra modalidade, a molécula de ligação, em particular, moléculas de ligação compreendendo região(ões) de CDR, podem compreender esqueletos não-tradicionais ou regiões de estrutura derivados de outros anticorpos, imunoglobulinas, ou moléculas tipo imunoglobulina (por exemplo, fibronectina), ou ser em parte ou inteiro, de origem sintética.

[00036] O termo "região definida" refere-se a uma região selecionada de um polipeptídeo. Tipicamente, a região definida inclui toda ou uma porção de um sítio funcional, por exemplo, o sítio de ligação de um ligante, o sítio de ligação de uma molécula de ligação ou receptor, ou um sítio catalítico. A região definida também pode incluir porções múltiplas de um sítio funcional. Por exemplo, a região definida pode incluir tudo, uma porção, ou porções múltiplas de uma região que determina complementaridade (CDR), por exemplo, uma única região de ligação de domínio, ou uma região variável completa de cadeia pesada e/ou leve (Fv) de um anticorpo. Assim, um sítio funcional pode incluir uma única região ou regiões múltiplas definidas que contribuem para a atividade funcional da molécula.

[00037] Os termos "aminoácido(s) funcional(is)" e "aminoácido(s)

não-funcional(is)" referem-se, respectivamente, aos resíduos de aminoácido (ou posição do resíduo de aminoácido correspondente) dentro de um polipeptídeo (ou porção deste) que são determinados (usando, por exemplo, os métodos da invenção) para contribuir para uma propriedade ou atividade mensuráveis do polipeptídeo. Consequentemente, um resíduo de aminoácido funcional (ou posição(ões) correspondente(s)) é referido como "zona(s) quente" visto que ele é um resíduo ou posição de resíduo que influencia a atividade do polipeptídeo quando comparado a resíduo(s) ou posição(ões) não-funcionais que não influenciam a atividade do polipeptídeo e portanto referido como "zona(s) fria(s)". Um resíduo de aminoácido funcional (ou posição) é distinguido de um resíduo de aminoácido não-funcional (ou posição) como sendo adequado para a mutagênese. Tipicamente, quando aplicando os métodos da invenção para a investigação de uma molécula de anticorpo, os resíduos de aminoácido que alteram, por exemplo, a ligação de antígeno, são considerados resíduos/posições funcionais (isto é, zonas quentes) ao passo que os resíduos que não alteram tal ligação são referidos como resíduos/posições não-funcionais (isto é, zonas frias).

[00038] O termo "propriedade mensurável" refere-se a uma propriedade ou atividade funcione de um polipeptídeo (ou porção deste) que pode ser medida, determinada, ou ensaiada quanto a, usando técnicas-padrão e incluem, atividade de ligação, atividade de cinase, atividade catalítica, atividade térmica, ou estabilidade enzimática. As propriedades mensuráveis de polipeptídeos que são polipeptídeos de ligação de antígeno, por exemplo, anticorpos, tipicamente incluem especificidade de ligação, avidéz de ligação, afinidade de ligação, ligação do receptor Fc, glicosilação, ligação do complemento, estabilidade de meia-vida, solubilidade, atividade térmica, atividade catalítica, e estabilidade enzimática.

[00039] O termo "mutagênese look-through" ou "LTM" refere-se a um método para introduzir um aminoácido predeterminado essencialmente em cada posição dentro de uma região definida (ou várias regiões diferentes) da sequência de aminoácido de um polipeptídeo. Uma biblioteca de polipeptídeo é gerada contendo análogos de polipeptídeo que individualmente não têm mais do que um aminoácido predeterminado, mas que coletivamente têm o aminoácido predeterminado em cada posição dentro da(s) região(ões) definida(s).

[00040] O termo "mutagênese look-through melhorada" ou "LTM2" refere-se a LTM conduzida de modo a identificar ou distinguir os resíduos de aminoácido funcionais (zonas quentes) dos resíduos de aminoácido não-funcionais (zonas frias). Consequentemente, o método de LTM2 leva em consideração introduzir seletivamente um aminoácido predeterminado nas posições de resíduo de aminoácido funcionais dentro de um polipeptídeo (ou porção deste). As bibliotecas de LTM2 correspondentes portanto são enriquecidas por polipeptídeos análogos tendo alterações de aminoácido mais prováveis a conferir uma propriedade alterada ou realçada. A LTM2 pode ser realizada subsequente a LTM ou fundamentada em informação a priori como para a funcionalidade de um resíduo de aminoácido ou posição de resíduo dados.

[00041] O termo "biblioteca" refere-se a duas ou mais moléculas mutagenizadas de acordo com o método da invenção. As moléculas da biblioteca podem estar na forma de polinucleotídeos, polipeptídeos, polinucleotídeos e polipeptídeos, polinucleotídeos e polipeptídeos em um extrato livre de célula, ou como polinucleotídeos e/ou polipeptídeos no contexto de um fago, células procarióticas, ou em células eucarióticas. As bibliotecas da invenção podem conter 2 ou mais moléculas ou análogos de polipeptídeo, por exemplo cerca de 2 a 10, cerca de 10 a 50, cerca de 50 a 102, cerca de 103, cerca de 104, cerca

de 105, cerca de 106, cerca de 107, cerca de 108, cerca de 109, cerca de 1010, cerca de 1011, cerca de 1012, cerca de 1013, ou mais, ou qualquer intervalo ou faixa do precedente.

[00042] O termo "mutagenizando" refere-se à alteração de uma sequência de aminoácido. Isto pode ser obtido alterando-se ou produzindo-se um ácido nucléico (polinucleotídeo) capaz de codificar a sequência de aminoácido alterada, ou pela síntese direta de um polipeptídeo alterado usando a química da proteína.

[00043] O termo "mutagênese" refere-se, a menos que de outro modo especificado, a qualquer técnica reconhecida no ramo para alterar uma sequência de polinucleotídeo ou polipeptídeo. Os tipos preferidos de mutagênese incluem mutagênese por condução (WTM), mutagênese por condução benéfica, mutagênese look-through (LTM), mutagênese look-through melhorada (LTM2), ou combinações destes.

[00044] O termo "mutagênese benéfica combinatória" refere-se a uma biblioteca de combinação de sequências de codificação que codifica misturas degeneradas de variações da sequência de aminoácido de CDR de VL e/ou de VH inicialmente identificadas da triagem de mutagênese de aminoácido LTM predeterminada como tendo uma alteração em uma propriedade mensurável. No método de mutação benéfica combinatória, as sequências de codificação de oligonucleotídeo são geradas que representam as combinações destas mutações benéficas identificadas por LTM. Estas combinações podem ser combinações de mutações benéficas diferentes dentro de uma única CDR, mutações dentro de duas ou mais CDRs dentro de uma única cadeia de anticorpo, ou mutações dentro das CDRs de cadeias de anticorpo diferentes.

[00045] O termo "polinucleotídeo(s)" refere-se aos ácidos nucléicos tais como moléculas de DNA e moléculas de RNA e análogos destas (por exemplo, DNA ou RNA gerados usando análogos de nucleotídeo

ou usando química do ácido nucléico). Como desejado, os polinucleotídeos podem ser fabricados sinteticamente, por exemplo, usando a química do ácido nucléico reconhecida na técnica ou enzimaticamente usando, por exemplo, uma polimerase. As modificações típicas incluem metilação, biotinilação, e outras modificações conhecidas na técnica. Além disso, a molécula de ácido nucléico pode ser de fita simples ou de fita dupla e, onde desejado, ligada ou associada (por exemplo, covalentemente ou não-covalentemente) a uma porção detectável.

[00046] O termo "polinucleotídeo variante" refere-se a um polinucleotídeo que codifica um análogo de polinucleotídeo correspondente (ou porção deste) da invenção. Assim, os polinucleotídeos variantes contêm um ou mais códons que foram mudados para resultar na expressão de um aminoácido diferente.

[00047] O termo "polipeptídeo(s)" refere-se a dois ou mais aminoácidos unidos por uma ligação de peptídeo, por exemplo, peptídeos (por exemplo, de 2 a ~ 50 resíduos de aminoácido), assim como sequências de peptídeo mais longas por exemplo, sequências de proteína que tipicamente compreendem as sequências de aminoácido de somente 50 resíduos de aminoácido a mais do que 1.000 resíduos de aminoácido.

[00048] O termo "mistura" refere-se à combinação de variantes de polinucleotídeo ou análogos de polipeptídeo para formar bibliotecas representando a mutagênese look-through (LTM) ou mutagênese look-through melhorada (LTM2) de uma região de polipeptídeo inteira. As moléculas podem estar na forma de um polinucleotídeo e/ou polipeptídeo e podem coexistir na forma de uma sub-biblioteca, como moléculas em um suporte sólido, como moléculas em solução, e/ou como moléculas em um ou mais organismos (por exemplo, fago, células procarióticas, ou células eucarióticas).

[00049] O termo "aminoácido predeterminado" refere-se a um resíduo de aminoácido selecionado quanto à substituição em cada posição dentro de uma região definida de um polipeptídeo a ser mutagenizado. Este não inclui a(s) posição(s) dentro da região que já (por exemplo, naturalmente) contém o aminoácido predeterminado e, assim, que não precisa ser substituída com o aminoácido predeterminado. Consequentemente, cada análogo de polinucleotídeo gerado de acordo com a presente invenção não contém mais que um resíduo de "aminoácido predeterminado" em uma região definida fornecida. Entretanto, coletivamente, a biblioteca de análogos de polipeptídeo gerados contém o aminoácido predeterminado em cada posição dentro da região que é mutagenizada, e em uma modalidade preferida, em posições de aminoácido determinadas serem funcionais (zonas quentes). Tipicamente, um aminoácido predeterminado é selecionado quanto a um tamanho ou química particulares usualmente associados com o grupo lateral do aminoácido. Os aminoácidos predeterminados adequados incluem, por exemplo, glicina e alanina (estericamente pequena); serina, treonina e cisteína (nucleofílica); valina, leucina, isoleucina, metionina e prolina (hidrofóbico); fenilalanina, tirosina e triptofano (aromático); aspartato e glutamato (ácido); asparagina, glutamina, e histidina (amida); e lisina e arginina (básica). O uso de resíduos de aminoácido não-tradicionais (por exemplo, homocisteína) também está dentro do escopo da invenção e pode ser introduzido usando quaisquer técnicas reconhecidas no ramo.

Descrição Detalhada

[00050] O estudo das proteínas tem revelado que certos aminoácidos desempenham um papel crucial em sua estrutura e função. Por exemplo, parece que apenas um número discreto de aminoácidos participa na ligação de um anticorpo a um antígeno ou está envolvido no evento catalítico de uma enzima.

[00051] Ainda que seja claro que certos aminoácidos são críticos à atividade ou função das proteínas, é difícil identificar quais aminoácidos estão envolvidos, como eles estão envolvidos, e quais substituições podem melhorar a estrutura ou função da proteína. Em parte, isto é devido à complexidade da configuração espacial das cadeias laterais de aminoácido em polipeptídeos e a relação mútua de porções diferentes do polipeptídeo que contribuem para formar um sítio funcional. Por exemplo, a relação mútua entre as seis CDRs das regiões de cadeia pesada e leve variáveis de um anticorpo contribui para a bolsa de ligação de antígeno ou ligante.

[00052] Os métodos de mutagênese prévios, tais como mutagênese seletiva (dirigida ao sítio) e mutagênese por saturação, são de utilidade limitada para o estudo da estrutura e função em vista do enorme número de variações possíveis em polipeptídeos complexos. Isto é especialmente verdade contanto que as combinações desejáveis são frequentemente acompanhadas pela presença de vastas quantidades de combinações indesejáveis ou o assim chamado ruído.

[00053] O método desta invenção fornece um método sistemático, prático, e altamente preciso para avaliar o papel de aminoácidos particulares e sua posição, dentro de uma região definida de um polipeptídeo, na estrutura ou função do polipeptídeo e, assim, para produzir polipeptídeos melhorados.

1. Seleccionando uma Região Definida

[00054] De acordo com a presente invenção, uma região ou regiões definidas dentro de uma proteína são seleccionadas quanto à mutagênese. Tipicamente, acredita-se que as regiões sejam importantes à estrutura e à função da proteína. Isto pode ser deduzido, por exemplo, de quais aspectos estruturais e/ou funcionais são conhecidos ou pode ser deduzido da comparação da(s) região(ões) definida(s) ao que é conhecido do estudo de outras proteínas, e pode

ser auxiliado por informação por moldagem. Por exemplo, a região definida pode ser uma que tem um papel em um sítio funcional, por exemplo, em ligação, catálise, ou uma outra função. Em uma modalidade, a região definida é uma região de hiperligação ou região que determina complementaridade (CDR) de uma molécula de ligação de antígeno (ver, por exemplo, A figura 1). Em uma outra modalidade, a região definida é uma porção de uma região que determina complementaridade (CDR). Em outras modalidades, duas ou mais regiões definidas, por exemplo, CDRs ou porções destas, são selecionadas quanto à mutagênese.

2. Selecionando um Resíduo de Aminoácido Predeterminado

[00055] O resíduo de aminoácido escolhido para a substituição dentro da(s) região(ões) definida(s) no geral é selecionado daqueles conhecidos estarem envolvidos na estrutura ou função de interesse. Os vinte aminoácidos que ocorrem naturalmente diferem com respeito à sua cadeia lateral. Cada cadeia lateral é responsável por propriedades químicas que tornam cada aminoácido único. Para o propósito de alterar a ligação ou criar novas afinidades de ligação, qualquer um ou todos os vinte aminoácidos que ocorrem naturalmente no geral podem ser selecionados, assim como resíduos de aminoácido não-tradicionais (por exemplo, homocisteína). Assim, os métodos anteriores de mutagênese, que criaram vastos números de análogos para cada substituição, foram não práticos para avaliar o efeito na ligação da proteína de substituição de cada um dos vinte aminoácidos. Ao contrário, os métodos da presente invenção criam um número prático de análogos para cada substituição de aminoácido e, assim, leva em consideração a avaliação de uma variedade maior de químicas de proteína dentro de uma região ou regiões segregadas de uma proteína.

[00056] Ao contrário da ligação da proteína, apenas um subconjunto de resíduos de aminoácido tipicamente participa em eventos

enzimáticos ou catalíticos. Por exemplo, a partir das propriedades químicas das cadeias laterais, apenas um número selecionado de aminoácidos naturais preferencialmente participam em eventos catalíticos. Tais grupamentos de químicas da cadeia lateral de aminoácido são úteis para selecionar um resíduo de aminoácido apropriado para o uso no perfil químico de um resíduo ou posição de aminoácido particular. Estes aminoácidos pertencem ao grupo de aminoácidos polares e neutros tais como Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, e Cys, ao grupo de aminoácidos carregados, Asp e Glu, Lys e Arg, e especialmente ao aminoácido His. Outras cadeias laterais polares e neutras são aquelas de Cys, Ser, Thr, Asn, Gln e Tyr. Gly também é considerado ser um membro incerto deste grupo. Ser e Thr desempenham um papel importante em formar ligações de hidrogênio. Thr tem uma assimetria adicional no carbono beta, portanto apenas um dos estereoisômeros é usado. A amida ácida Gln e Asn também pode formar ligações de hidrogênio, os grupos amido funcionando como doadores de hidrogênio e os grupos carbonila funcionando como aceitantes. Gln tem mais um grupo CH₂ do que Asn que torna o grupo polar mais flexível e reduz sua interação com a cadeia principal. Tyr tem um grupo hidroxila muito polar (OH fenólica) que pode dissociar em valores de pH altos. Tyr comporta-se um pouco como uma cadeia lateral carregada; suas ligações de hidrogênio são muito fortes.

[00057] Os ácidos polares neutros são encontrados na superfície assim como dentro de moléculas de proteína. Como resíduos internos, eles usualmente formam ligações de hidrogênio entre si ou com a cadeia principal de polipeptídeo. Cys podem formar pontes de dissulfeto.

[00058] A histidina (His) tem uma cadeia lateral heterocíclica aromática com um valor de pK de 6,0. Na faixa de pH fisiológico, seu anel de imidazol pode ser não carregado ou carregado, depois de

absorver um íon hidrogênio da solução. Visto que estes dois estados estão prontamente disponíveis, His é muito adequado para catalisar as reações químicas. Ele é encontrado na maioria dos centros ativos de enzimas, por exemplo, serina proteases.

[00059] Asp e Glu são negativamente carregados no pH fisiológico. Por causa de sua cadeia lateral curta, o grupo carboxila de Asp é muito rígido com respeito à cadeia principal. Isto pode ser a razão porque o grupo carboxila em muitos sítios catalíticos é fornecido por Asp e não por Glu. Os ácidos carregados no geral são encontrados na superfície de um polipeptídeo.

[00060] Além disso, Lys e Arg são encontrados na superfície. Eles têm cadeias laterais longas e flexíveis apresentando rotâmeros múltiplos de energias similares. Em vários casos, Lys e Arg tomam parte na formação de pontes de sal internas ou eles ajudam na catálise. Por causa de sua exposição na superfície do polipeptídeo, Lys é um resíduo mais frequentemente reconhecido pelas enzimas que modificam a cadeia lateral ou clivam a cadeia de peptídeo na extremidade carbonila dos resíduos de Lys.

[00061] Embora a química do grupo lateral de um aminoácido possa guiar a seleção de um resíduo de aminoácido predeterminado, a carência de uma química do grupo lateral desejada pode ser um critério para excluir um resíduo de aminoácido para o uso como o aminoácido predeterminado. Por exemplo, os aminoácidos estericamente pequenos e quimicamente neutros, tais como alanina, podem ser excluídos da Mutagênese look-through para carecer de uma química desejada.

3. Sintetizando Bibliotecas de Análogo de Polipeptídeo.

[00062] Em uma modalidade, uma biblioteca de análogos de polipeptídeo é gerada para a triagem sintetizando-se oligonucleotídeos individuais que codificam a região definida do polipeptídeo e não têm mais do que um códon para o aminoácido predeterminado. Isto é

realizado incorporando-se, em cada posição do códon dentro do oligonucleotídeo o códon necessário para a síntese do polipeptídeo do tipo selvagem ou um códon para o aminoácido predeterminado. Isto difere dos oligonucleotídeos produzidos na mutagênese por saturação, mutagênese aleatória, ou mutagênese por condução em que, para cada oligonucleotídeo, apenas uma mutação, como oposta às mutações múltiplas é feita.

[00063] Os oligonucleotídeos podem ser produzidos individualmente e depois misturados ou combinados como desejado. Quando o códon da sequência do tipo selvagem e o códon para o aminoácido predeterminado são os mesmos, nenhuma substituição é feita.

[00064] Consequentemente, o número de posições de aminoácido dentro da região definida determinará o número máximo de oligonucleotídeos fabricados. Por exemplo, se cinco posições de códon forem alteradas com o aminoácido predeterminado, então cinco polinucleotídeos mais um polinucleotídeo representando a sequência de aminoácido do tipo selvagem são sintetizados. Duas ou mais regiões simultaneamente podem ser alteradas. Em uma modalidade, os resíduos de aminoácido (posições) dentro da região definida que são mutagenizados são resíduos de aminoácido funcionais (posições). Em uma outra modalidade, os resíduos de aminoácido funcionais (posições) são exclusivamente mutagenizados.

[00065] A mistura de oligonucleotídeos para a geração da biblioteca pode ser sintetizada facilmente por métodos conhecidos para a síntese de DNA. O método preferido envolve o uso de química de beta-cianoetil fosforamidita de fase sólida. Ver a Pat. U.S. No 4.725.677. Por conveniência, um instrumento para a síntese de DNA automatizada pode ser usado contendo vasos de reagente específico de nucleotídeos. Os polinucleotídeos também podem ser sintetizados para conter sítios de restrição ou sítios de hibridização de iniciador para facilitar a

introdução ou a montagem dos polinucleotídeos representando, por exemplo, uma região definida, em um contexto genético maior.

[00066] Os polinucleotídeos sintetizados podem ser inseridos em um contexto genético maior do polipeptídeo que é mutagenizado usando-se técnicas de engenharia genética padrão. Por exemplo, os polinucleotídeos podem ser fabricados para conter sítios de reconhecimento de flanqueamento para as enzimas de restrição. Ver Crea, R., Patente U.S. Nº 4.888.286. Os sítios de reconhecimento são designados a corresponder aos sítios de reconhecimento que existem naturalmente ou são introduzidos no gene próximo à região de codificação de DNA. Depois da conversão na forma de fita dupla, os polinucleotídeos são ligados no gene por técnicas-padrão. Por meio de um vetor apropriado (incluindo, por exemplo, vetores de fago, plasmídeos) os genes podem ser introduzidos em um extrato isento de célula, fago, célula procariótica, ou célula eucariótica adequados para a expressão dos polipeptídeos mutantes.

[00067] Nos casos onde a sequência de aminoácido do polipeptídeo a ser mutagenizado é conhecida ou onde a sequência de DNA é conhecida, a síntese genética é um método possível. Por exemplo, os polinucleotídeos parcialmente de sobreposição, tipicamente cerca de 20 a 60 nucleotídeos em comprimento podem ser projetados. Os polinucleotídeos internos depois são fosforilados anelados ao seu parceiro complementar para fornecer uma molécula de DNA de fita dupla com as extensões de fita simples úteis para outro anelamento. Os pares anelados depois podem ser misturados juntos e ligados para formar uma molécula de fita dupla de tamanho natural (ver, por exemplo, A figura 8). Os sítios de restrição convenientes podem ser projetados próximo às extremidades do gene sintético para a clonagem em um vetor adequado. As moléculas de tamanho natural podem ser clivadas com aquelas enzimas de restrição e ligadas em um vetor adequado. Os

sítios de restrição convenientes também podem ser incorporados na sequência do gene sintético para facilitar a introdução dos cassetes mutagênicos.

[00068] Como uma alternativa para os polinucleotídeos de sintetização que representam o gene de fita dupla de tamanho natural, os polinucleotídeos que parcialmente sobrepõem em suas extremidades 3' (isto é, com extremidades 3' complementares) podem ser montados em uma estrutura intervalada e depois enchidos com uma polimerase adequada para fabricar um gene de fita dupla de tamanho natural. Tipicamente, os polinucleotídeos de sobreposição são de 40 a 90 nucleotídeos em comprimento. Os polinucleotídeos prolongados depois são ligados. Os sítios de restrição convenientes podem ser introduzidos nas extremidades e/ou internamente para propósitos de clonagem. Seguindo a digestão com uma enzima ou enzimas de restrição apropriadas, o fragmento de gene é ligado em um vetor adequado. Alternativamente, o fragmento de gene pode ser ligado na extremidade cega em um vetor apropriado.

[00069] Nestes métodos, se os sítios de restrição convenientes estiverem disponíveis (naturalmente ou engenheirados) seguindo a montagem de gene, os polinucleotídeos degenerados podem ser introduzidos subsequentemente clonando-se o cassete em um vetor apropriado. Alternativamente, os polinucleotídeos degenerados podem ser incorporados no estágio da montagem de gene. Por exemplo, quando ambas as fitas do gene são completa e quimicamente sintetizados, os polinucleotídeos degenerados de sobreposição e complementares podem ser produzidos. Os pares complementares anelarão entre si.

[00070] Quando os polinucleotídeos parcialmente de sobreposição são usados na montagem de gene, um conjunto de nucleotídeos degenerados também pode ser diretamente incorporado ao invés de um

dos polinucleotídeos. A fita complementar apropriada é sintetizada durante a reação de extensão a partir de um polinucleotídeo parcialmente complementar da outra fita por extensão enzimática com uma polimerase. A incorporação dos polinucleotídeos degenerados no estágio de síntese também simplifica a clonagem onde mais do que um domínio ou região definida de um gene são mutagenizados.

[00071] Em um outro método, o gene de interesse está presente em um plasmídeo de fita simples. Por exemplo, o gene pode ser clonado em um vetor de fago ou um vetor com uma origem de fago filamentosa de replicação que permite a propagação das moléculas de fita simples com o uso de um fago ajudante. O modelo de fita simples pode ser anelado com um conjunto de polinucleotídeos degenerados representando as mutações desejadas e alongado e ligado, assim incorporando cada fita análoga em uma população de moléculas que podem ser introduzidas em um hospedeiro apropriado (Sayers, J. R. *et al.*, Nucleic Acids Res. 16: 791-802 (1988)). Este método pode evitar as etapas de clonagem múltiplas onde os domínios múltiplos são selecionados quanto à mutagênese.

[00072] A metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) também pode ser usada para incorporar os polinucleotídeos em um gene. Por exemplo, os polinucleotídeos por si só podem ser usados como iniciadores para a extensão. Neste método, os polinucleotídeos que codificam os cassetes mutagênicos que correspondem à região definida (ou porção desta) são complementares entre si, pelo menos em parte, e podem ser prolongados para formar um cassete genético grande usando uma polimerase, por exemplo, usando amplificação de PCR (ver, por exemplo, A figura 2).

[00073] O tamanho da biblioteca variará dependendo do comprimento e número de regiões e aminoácidos dentro de uma região que são mutagenizados. Preferivelmente, a biblioteca será designada a

conter menos do que 1015, 1014, 1013, 1012, 1011, 1010, 109, 108, 107, e mais preferivelmente, 106 análogos de polipeptídeo ou menos.

[00074] A descrição acima tem centrado na mutagênese dos polipeptídeos e bibliotecas de polipeptídeos alterando-se o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo correspondente. É entendido, entretanto, que o escopo da invenção também abrange os métodos de mutagenizar os polipeptídeos por síntese direta dos análogos de polipeptídeo desejados usando a química da proteína. Em realizar este método, os polipeptídeos resultantes incorporam ainda as características da invenção exceto que o uso de um intermediário de polinucleotídeo é eliminado.

[00075] Para as bibliotecas descritas acima, se na forma de polinucleotídeos e/ou polipeptídeos correspondentes, é entendido que as bibliotecas também podem ser fixadas a um suporte sólido, tal como um microchip, e preferivelmente arranjadas, usando as técnicas reconhecidas no ramo.

4. Sistemas de Expressão e Triagem

[00076] As bibliotecas de polinucleotídeos geradas por qualquer uma das técnicas acima ou outras técnicas adequadas podem ser expressadas e triadas para identificar os análogos de polipeptídeo tendo estrutura e/ou atividade desejadas. A expressão dos análogos de polipeptídeo pode ser realizada usando qualquer sistema de exibição de expressão adequado conhecido na técnica incluindo, mas não limitado a sistemas de exibição de extrato isento de célula (por exemplo, exibição de ribossomo e sistemas de exibição arranjada (por exemplo, microarranjada ou macroarranjada)), sistemas de exibição bacteriana, sistemas de exibição de fago, células procarióticas, e/ou células eucarióticas (por exemplo, sistemas de exibição de levedura).

[00077] Em uma modalidade, os polinucleotídeos são engendrados para servir como modelos que podem ser expressados em um extrato

livre de célula. Os vetores e extratos como descritos, por exemplo nas Patentes U.S. Nos 5.324.637; 5.492.817; 5.665.563, podem ser usados e muitos estão comercialmente disponíveis. A exibição de ribossomo e outras técnicas isentas de célula para ligar um polinucleotídeo (isto é, um genótipo) a um polipeptídeo (isto é, um fenótipo) podem ser usadas, por exemplo, Profusion® (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.348.315; 6.261.804; 6.258.558; e 6.214.553).

[00078] Alternativamente, os polinucleotídeos da invenção podem ser expressados em um sistema de expressão procariótica conveniente tal como o sistema de expressão de *E. coli* bacteriana, tal como aquele descrito por Pluckthun e Skerra. (Pluckthun, A. e Skerra, A., Meth. Enzymol. 178: 476-515 (1989); Skerra, A. et al., Biotechnology 9: 273-278 (1991)). As proteínas mutantes podem ser expressadas quanto à secreção no meio e/ou no citoplasma das bactérias, como descrito por M. Better e A. Horwitz, Meth. Enzymol. 178: 476 (1989). Em uma modalidade, os únicos domínios que codificam V_H e V_L são, cada um, fixados à extremidade 3' de uma sequência que codifica uma sequência de sinal, tal como a sequência de sinal *ompA*, *phoA* ou *pelB* (Lei, S. P. et al., Bacteriol. 169: 4379 (1987)). Estas fusões de gene são montadas em uma construção dicistrônica, de modo que elas podem ser expressadas a partir de um único vetor, e secretadas no espaço periplasmático de *E. coli* onde elas reduplicarão e poderão ser recuperadas na forma ativa. (Skerra, A. et al., Biotechnology 9: 273-278 (1991)). Por exemplo, os genes de cadeia pesada de anticorpo podem ser concorrentemente expressados com genes de cadeia leve de anticorpo para produzir o anticorpo ou fragmentos de anticorpo.

[00079] Ainda em uma outra modalidade, os polinucleotídeos podem ser expressados em células eucarióticas tais como levedura usando, por exemplo, a exibição de levedura como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos 6.423.538; 6.331.391; e 6.300.065. Neste método, os

análogos de polipeptídeo da biblioteca são fundidos a um polipeptídeo que é expressado e exibido na superfície da levedura. Outras células eucarióticas para a expressão dos polipeptídeos da invenção também podem ser usadas tais como células mamíferas, por exemplo, células de mieloma, células de hibridoma, ou células do ovário de hamster Chinês (CHO). Tipicamente, os análogos de polipeptídeo quando expressados em células mamíferas são designados a ser expressados no meio de cultura, ou expressados na superfície de uma tal célula. O anticorpo ou fragmentos de anticorpo podem ser produzidos, por exemplo, como moléculas de anticorpo inteiras ou como fragmentos de VH e de VL individuais, fragmentos Fab, domínios únicos, ou como anticorpos de cadeia simples (scFv) (ver Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)).

[00080] A triagem dos análogos de polipeptídeo expressados (ou polipeptídeos produzidos pela síntese direta) pode ser feita por quaisquer meios apropriados. Por exemplo, a atividade de ligação pode ser avaliada por imunoensaio padrão e/ou cromatografia por afinidade e a atividade catalítica pode ser determinada por ensaios adequados para a conversão do substrato. A triagem dos análogos de polipeptídeo da invenção quanto à função proteolítica pode ser realizada usando um ensaio de placa de hemoglobina padrão como descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.798.208.

5. Mutagênese look-through Melhorada Auxiliada por Modelagem por Computador

[00081] A mutagênese look-through da invenção também pode ser conduzida com o benefício da informação estrutural ou por moldagem que dizem respeito aos análogos de polipeptídeo a serem gerados, tal que o potencial para gerar os análogos tendo a função melhorada desejada é aumentado. A informação estrutural ou por moldagem também pode ser usada para guiar a seleção de aminoácido

predeterminado para introduzir nas regiões definidas. Ainda mais, os resultados reais obtidos com os análogos de polipeptídeo da invenção podem guiar a seleção (ou exclusão) de polipeptídeos subsequentes a serem fabricados e triados em uma maneira iterativa. Consequentemente, a informação estrutural ou por moldagem pode ser usada para gerar subconjuntos iniciais de análogos de polipeptídeo para o uso na invenção, deste modo aumentando ainda a eficiência de gerar polipeptídeos melhorados.

[00082] Em uma modalidade particular, a modelagem *in silico* é usada para eliminar a produção de qualquer análogo de polinucleotídeo prognosticado a ter estrutura e/ou função deficientes ou indesejadas. Deste modo, o número de análogos de polipeptídeo a serem produzidos pode ser repentinamente reduzido aumentando deste modo a relação sinal/ruído em ensaios de triagem subsequentes. Em uma modalidade particular, os resíduos de aminoácido funcionais (posições) ou zonas quentes são identificados como adequados para a mutagênese ao passo que os resíduos de aminoácido não-funcionais (posições) ou zonas frias, são excluídos. Em uma outra modalidade particular, a modelagem *in silico* é continuamente atualizada com informação por moldagem adicional, de qualquer fonte relevante, por exemplo, de sequência de gene e proteína e bases de dados tridimensionais e/ou resultados de análogos previamente testados, de modo que a base de dados *in silico* torna-se mais precisa em sua capacidade profética.

[00083] Ainda em uma outra modalidade, a base de dados *in silico* é fornecida com os resultados do ensaio dos análogos de polipeptídeo previamente testados e categoriza os análogos, com base no critério ou critérios de ensaio, como respondedores ou não-respondedores, por exemplo, como análogos de polipeptídeo que se ligam bem ou não tão bem ou como sendo enzimáticos/catalíticos ou não tão enzimáticos/catalíticos. Deste modo, a mutagênese da invenção pode

igualar uma faixa de resposta funcional com informação estrutural particular e usar tal informação para guiar a produção de análogos de polipeptídeo futuros a serem testados. Consequentemente, o método é especialmente adequado para triar o anticorpo ou fragmentos de anticorpo quanto a uma função particular, tal como afinidade de ligação (por exemplo, especificidade), estabilidade (por exemplo, meia-vida) e/ou função efetora (por exemplo, ativação do complemento e ADCC) alvejando-se as zonas quentes quanto à mutagênese. Consequentemente, a mutagênese de resíduos não-contíguos dentro de uma região pode ser desejável se ela for conhecida, por exemplo, através da modelagem *in silico*, que certos resíduos na região não participarão na função desejada. A estrutura coordenada e a relação mútua espacial entre as regiões definidas, por exemplo, os resíduos de aminoácido funcionais nas regiões definidas do polipeptídeo, por exemplo, o(s) aminoácido(s) predeterminado(s) que foi(foram) introduzido(s), podem ser consideradas e modeladas. Tais critérios de modelagem incluem, por exemplo, química do grupo lateral do resíduo de aminoácido, distâncias atômicas, dados de cristalografia, etc. Consequentemente, o número de análogos de polipeptídeo a serem produzidos pode ser inteligentemente minimizado.

[00084] Em uma modalidade preferida, uma ou mais das etapas acima são auxiliadas por computador. O método também é acessível para ser realizado, em parte ou no total, por um dispositivo, por exemplo, um dispositivo conduzido por computador. Consequentemente, as instruções para realizar o método, em parte ou no total, podem ser conferidas a um meio adequado para o uso em um dispositivo eletrônico para realizar as instruções. Em resumo, os métodos da invenção são aperfeiçoáveis a um método de rendimento alto compreendendo software (por exemplo, instruções legíveis por computador) e hardware (por exemplo, computadores, robótica e chips).

6. Explorando a Química Combinatória das Regiões Múltiplas Definidas

[00085] A presente invenção fornece a vantagem importante de levar em consideração a avaliação por mutagênese de várias regiões ou domínios diferentes de um polipeptídeo simultaneamente. Isto pode ser feito usando o mesmo aminoácido predeterminado ou um diferente dentro de cada região, permitindo a avaliação de substituições de aminoácido em regiões conformacionalmente relacionadas, tais como as regiões que na reduplicação do polipeptídeo, são associadas para preparar um sítio funcional (por exemplo, o sítio de ligação de um anticorpo ou o sítio catalítico de uma enzima). Isto, por sua vez, fornece um modo eficiente para criar sítios funcionais novos ou melhorados.

[00086] Por exemplo, as seis CDRs de um anticorpo que preparam os únicos aspectos do sítio de ligação de antígeno (região Fv), podem ser mutagenizadas simultaneamente, ou separadamente dentro das cadeias VH ou VL, para estudar a relação mútua tridimensional de aminoácidos selecionados neste sítio. Em uma modalidade, a química combinatória de três ou mais regiões definidas é sistematicamente explorada usando mutagênese look-through, e preferivelmente seis regiões definidas, por exemplo, as seis CDRs de uma região variável de cadeia pesada e leve de anticorpo. Para realizar a mutagênese look-through em uma CDR, tipicamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, ou mais posições de aminoácido são alteradas. Os resíduos de aminoácido funcionais depois são distinguidos dos resíduos de aminoácido não-funcionais e identificados como adequados para outra mutagênese.

[00087] Consequentemente, a presente invenção abre novas possibilidades para o projeto de muitos tipos diferentes de polipeptídeos novos e melhorados. O método pode ser usado para aperfeiçoar uma estrutura ou função existentes de uma proteína. Por exemplo, um sítio de ligação para um anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser

introduzido ou afinidade por um antígeno preexistente, função efetora e/ou estabilidade melhorada. Alternativamente, a introdução de aminoácidos adicionais "cataliticamente importantes" em um domínio catalítico de uma enzima pode ser realizada resultando em uma atividade catalítica modificada ou realçada para um substrato. Alternativamente, estruturas, especificidades ou atividades inteiramente novas podem ser introduzidas em um polipeptídeo. A síntese *de novo* da estabilidade enzimática também pode ser obtida. As novas estruturas podem ser construídas na "estrutura" natural ou de consenso de uma proteína existente por mutação apenas das regiões relevantes (por exemplo, resíduos de aminoácido funcionais (posições)) pelo método da invenção.

7. Mutagênese look-through Melhorada (LTM2) para Fabricar Anticorpos Novos ou Melhorados

[00088] O método desta invenção é especialmente útil para modificar moléculas de anticorpo. Como aqui usado, as moléculas de anticorpo ou anticorpos referem-se aos anticorpos ou porções destes, tais como anticorpos de tamanho natural, moléculas Fv, ou outros fragmentos de anticorpo, cadeias individuais ou fragmentos destes (por exemplo, uma única cadeia de Fv), anticorpos de cadeia simples (por exemplo, scFv), e anticorpos quiméricos. As alterações podem ser introduzidas na região variável e/ou na região de estrutura (constante) de um anticorpo. A modificação da região variável pode produzir anticorpos com melhores propriedades de ligação de antígeno, e, se desejado, propriedades catalíticas. A modificação da região de estrutura também pode levar à melhora de propriedades físico-químicas, tais como solubilidade ou estabilidade (por exemplo, meia-vida), que são especialmente úteis, por exemplo, na produção comercial, biodisponibilidade, função efetora (por exemplo, ativação do complemento e/ou ADCC) e afinidade de ligação (por exemplo,

especificidade) para o antígeno. Tipicamente, a mutagênese alveja a região Fv da molécula de anticorpo, isto é, a estrutura responsável pela atividade de ligação de antígeno que é composta de regiões variáveis de duas cadeias, uma da cadeia pesada (V_H) e uma da cadeia leve (V_L). Em particular, a mutagênese alveja resíduos de aminoácido funcionais (posições) que foram determinados contribuir para uma propriedade mensurável do anticorpo (por exemplo, ligação de antígeno, ligação do receptor Fc, etc.). Uma vez que as características de ligação de antígeno desejadas são identificadas, a(s) região(ões) variável(is) podem ser engenheiradas em uma classe de anticorpo apropriada tal como IgG, IgM, IgA, IgD, ou IgE.

8. Mutagênese look-through Melhorada (LTM2) para Fabricar/Melhorar os Polipeptídeos Catalíticos/Enzimáticos

[00089] O método da invenção também é particularmente adequado para o projeto de proteínas catalíticas, particularmente anticorpos catalíticos. Presentemente, os anticorpos catalíticos podem ser preparados por uma adaptação de técnicas de fusão de célula somática padrão. Neste processo, um animal é imunizado com um antígeno que é parecido com o estado de transição do substrato desejado para induzir a produção de um anticorpo que se liga ao estado de transição e catalisa a reação. As células que produzem anticorpo são colhidas do animal e fundidas com uma célula de imortalização para produzir células híbridas. Estas células depois são triadas quanto à secreção de um anticorpo que catalisa a reação. Este processo é dependente da disponibilidade de análogos do estado de transição de um substrato. O processo pode ser limitado porque tais análogos são prováveis a ser difíceis para identificar ou sintetizar na maioria dos casos.

[00090] O método da invenção fornece um método diferente que elimina a necessidade por um análogo do estado de transição. Pelo método da invenção, um anticorpo pode ser feito catalítico pela

introdução de aminoácidos adequados no sítio de ligação de uma imunoglobulina (região Fv). A região do sítio de ligação de antígeno (Fv) é composta de seis alças hipervariáveis (CDR), três derivadas da cadeia pesada (H) de imunoglobulina e três da cadeia leve (L), que conecta as fitas beta dentro de cada subunidade. Os resíduos de aminoácido das alças de CDR contribuem quase inteiramente para as características de ligação de cada anticorpo monoclonal específico. Por exemplo, tríades catalíticas (compreendendo dos resíduos de aminoácido serina, histidina, e ácido aspártico) modeladas depois que as serina proteases podem ser criadas nos segmentos hipervariáveis da região Fv de um anticorpo com afinidade conhecida pela molécula de substrato e triadas quanto à atividade proteolítica do substrato. Em uma modalidade preferida, os resíduos de aminoácido funcionais (posições) que foram determinados contribuir para uma propriedade mensurável do anticorpo, por exemplo, atividade catalítica, são alvejados.

[00091] Em particular, o método da invenção pode ser usado para produzir muitas enzimas ou anticorpos catalíticos diferentes, incluindo oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Entre estas classes, de importância particular será a produção de proteases, carboidrases, lipases, dioxigenases e peroxidases melhoradas. Estas e outras enzimas que podem ser preparadas pelo método da invenção têm aplicações comerciais importantes para as conversões enzimáticas no cuidado da saúde, cosméticos, alimentos, bebida fermentada, detergentes, ambiente (por exemplo, tratamento de água residual), agricultura, curtume, tecidos, e outros processos químicos. Estes incluem, mas não são limitados a aplicações de diagnóstico e terapêuticas, conversões de gorduras, carboidratos e proteína, degradação de poluentes orgânicos e síntese de produtos químicos. Por exemplo, as proteases terapeuticamente eficazes com atividade fibrinolítica, ou atividade contra estruturas virais necessária

para a infecciosidade, tais como proteínas de revestimento viral, podem ser engenheiradas. Tais proteases podem ser agentes antitrombóticos ou agentes antivirais úteis contra vírus tais como, por exemplo, HIV, rinovírus, influenza ou hepatite. No caso das oxigenases (por exemplo, dioxigenases), uma classe de enzimas que requerem um cofator para a oxidação de anéis aromáticos e outras ligações duplas, as aplicações industriais em processos de biodespulpagem, conversão de biomassa em combustíveis ou outros produtos químicos, conversão de contaminantes de água residual, bioprocessamento do carvão, e desintoxicação de compostos orgânicos perigosos são aplicações possíveis das novas proteínas. A identificação de melhoras para o precedente é expedida pelos métodos da invenção alvejando-se preferencialmente os resíduos de aminoácido funcionais (posições) que são mais prováveis contribuir para a atividade ou propriedade desejadas para as quais as melhoras são procuradas.

9. Métodos Combinatórios de Mutagênese

[00092] No método de mutação benéfica combinatória, as sequências de codificação são geradas que representam combinações das mutações benéficas identificadas por LTM. Estas combinações podem ser combinações de mutações benéficas diferentes dentro de uma única CDR, mutações dentro de duas ou mais CDRs dentro de uma única cadeia de anticorpo, ou mutações dentro das CDRs de cadeias de anticorpo diferentes.

[00093] Um método combinatório é parecido com o método de WTM exceto que as substituições de códon selecionadas dentro das CDRs são as substituições de aminoácido benéficas diferentes identificadas por LTM. Assim, nem toda posição de resíduo em uma CDR de anticorpo conterá uma mutação, e algumas posições terão aminoácidos diferentes múltiplos substituídos nesta posição. Em toda parte, muitas se não todas, combinações de mutações benéficas dentro de uma CDR

ou uma cadeia de anticorpo serão representadas por pelo menos uma das sequências de codificação na biblioteca. Como mostrado na Tabela 1, esta biblioteca de sequência de codificação pode ser preparada por uma modificação do método de WTM, exceto que ao invés de colocar códons para um único aminoácido em cada posição diferente na região de codificação variável, os códons que são introduzidos são aqueles correspondendo a todas as mutações benéficas detectadas no método de LTM. De modo a manter o tamanho desta biblioteca manejável, as mutações podem ser limitadas a uma das duas cadeias pesadas ou leves apenas.

[00094] Em um segundo método, os fragmentos de gene individuais contendo uma única região CDR, e tendo uma variação de códon que codifica todas as combinações de mutações benéficas dentro da CDR reconstruída, por exemplo, por métodos de embaralhamento de gene, para produzir sequências de codificação de cadeia VL e VH tendo combinações de mutações benéficas em todas as CDRs de uma cadeia dada ou todas as CDRs em ambas as cadeias.

[00095] Uma biblioteca combinatória de mutações também pode ser gerada por métodos de embaralhamento de gene conhecidos, tal como detalhado no pedido de patente U.S. 2003/005439A1, e Patente U.S. No 6.368.861, e (Stemmer WP (1994) Proc Natl Acad Sci 91(22): 10747-51), todos dos quais são incorporados aqui por referência. O método envolve a digestão de DNase I limitada dos clones de mutação mista coletados para produzir um conjunto de fragmentos de gene aleatórios de vários tamanhos predeterminados (por exemplo, 50 a 250 pares de base). Os fragmentos depois são primeiro desnaturados e os vários fragmentos separados depois são deixados reassociar com base nas regiões complementares homólogas. Desta maneira, os fragmentos renaturados podem incorporar CDRs de mutação mista diferentes nos segmentos reagrupados que depois são prolongados por SOE-PCR

como acima, e uma químera reagrupada depois pode incorporar, em um mínimo, pelo menos dois conjuntos de mutações mistas de CDR benéfica de cada doador de fonte de DNA parental.

[00096] A presente invenção é ilustrada ainda nos exemplos seguintes, que não devem ser interpretados como limitantes.

Exemplificação

[00097] Por todos os exemplos, os materiais e métodos seguintes foram usados a menos que de outro modo estabelecidos.

Materiais e Métodos

[00098] No geral, a prática da presente invenção utiliza, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais da química, biologia molecular, tecnologia de DNA recombinante, tecnologia de PCR, imunologia (especialmente, por exemplo, tecnologia de anticorpo), sistemas de expressão (por exemplo, expressão livre de célula, exibição de fago, exibição de ribossomo, e Profusion®), e qualquer cultura celular necessária que estejam dentro da habilidade da técnica e sejam explicados na literatura. Ver, por exemplo, Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *DNA Cloning*, Vols. 1 e 2, (D.N. 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); *The PCR Technique: RT-PCR*, Siebert, Ed., Eaton Pub. Co. (1998); *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); 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). Phage Display: A Laboratory Manual, C. Barbas (Ed.), CSHL Press, (2001); Antibody Phage Display, P O'Brien (Ed.), Humana Press (2001); Border *et al.*, Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nature Biotechnology, 15(6): 553-7 (1997); Border *et al.*, Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, Methods Enzymol., 328: 430-44 (2000); ribosome display como descrito por Pluckthun *et al.* na Patente U.S. Nº 6.348.315, e Profusion® como descrito por Szostak *et al.* nas Patentes U.S. Nºs 6.258.558; 6.261.804; e 6.214.553.

Construção do Gene de Teste

[00099] As sequências de Fab do tipo selvagem de ovalbumina foram usadas como padrões para as porções de V_L e V_H (SEQ ID NOS: 1 e 2 respectivamente) para a construção de scFv usando PCR e iniciadores apropriados (SEQ ID NOS: 11 e 12) e oligonucleotídeos V_H (SEQ ID NOS: 13 a 14). As reações e PCR consistiram em 2 μ L cada uma de 10 μ M estoque de oligonucleotídeo, 0,5 μ L de Pfx DNA polimerase (2,5 U/ μ L), 5 μ L de tampão de Pfx, 1 μ L de dNTP a 10 mM, 1 μ L de $MgSO_4$ a 50 mM e aqui conduzidas a 37,5 μ L de dH₂O a 94°C durante 2 min, seguido por 24 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, e 1 min a 68°C seguido por incubação a 68°C durante 5 min. Os oligonucleotídeos foram sintetizados no Oligossintetizador 3900 da Syngen Inc. (San Carlos, CA).

[000100] As reações de V_L e V_H e PCR acima depois foram separadamente extraídas e purificadas (kit de purificação de PCR Qiagen como pelas instruções do fabricante) e uma alíquota (1 μ L) de cada reação foi combinada em um novo tubo. Por meio da sequência ligante na extremidade 3' do oligonucleotídeo "reverso" de V_H (SEQ ID

NOS: 14) e na extremidade 5' do oligonucleotídeo "direto" de V_L (SEQ ID NOS: 11), a ligação complementar deixada para a reação de montagem de PCR de extensão de sobreposição única (SOE-PCR) para gerar a scFv de ovalbumina de tamanho natural. A reação de PCR de scFv de ovalbumina foi extraída e purificada (Qiagen) para a digestão por endonuclease EcoR I e Not I subsequente (New England Biolabs como pelas direções do fabricante). A scFv de ovalbumina de tamanho natural é subclonada no vetor pYD1 e sequenciada para confirmar que nenhuma mutação, deleção ou inserção foi introduzida (SEQ ID NO: 18) das PCRs acima. Uma vez que verificou-se a sequência, a ovalbumina de V_H e V_L de tamanho natural serve como o padrão do tipo selvagem para as estratégias subsequentes das bibliotecas de LTM de construção.

Condições de PCR Adicionais e Projeto Iniciador

[000101] As condições de reação para PCR T1 e T2 são; 5 µL de mistura de oligonucleotídeo a 10 uM, 0,5 µL de Pfx DNA polimerase (2,5 U/ µL), 5 µL de tampão de Pfx (Invitrogen), 1 µL de dNTP a 10 mM, 1 µL de MgSO₄ a 50 mM e 37,5 µL de dH₂O a 94°C durante 2 min, seguido por 24 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, e 1 min a 68°C e depois incubados durante 68°C durante 5 min. As reações são realizadas usando um ciclo térmico programável (MJ Research). As reações T1 e T2 e PCR foram purificadas com gel (Qiagen) e alíquotas equimolares de ambas foram combinadas para SOE-PCR.

[000102] A SOE-PCR é um método rápido e simples para combinar os fragmentos de DNA que não requerem sítios de restrição, endonucleases de restrição, ou DNA ligase. Os produtos de PCR T1 e T2 são designados a compartilhar sequências complementares de sobreposição na extremidade (Figura 4) que hibridizariam e permitiriam a extensão de PCR para produzir um gene scFV de ovalbumina de LTM de tamanho natural (Figs. 2 e 4). A reação de extensão de PCR de scFv

usou alíquotas de T1 e T2 (aproximadamente 2 µL cada) com 0,5 µL de Pfx DNA polimerase (2,5 U/µL), 5 µL de tampão de Pfx (Invitrogen), 1 µL de dNTP a 10 mM, 1 µL de MgSO₄ a 50 mM e 37,5 µL de dH₂O a 94°C durante 2 min, seguido por 20 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, e 1 min a 68°C e depois incubada por 68°C durante 5 min.

[000103] Um conjunto de iniciadores senso de EcoR I 5' específico de extremidade de ovalbumina (SEQ ID NO: 18) e antissenso de Not I 3' de ovalbumina (SEQ ID NO: 19) foram adicionados para facilitar a amplificação e incorporação de ovalbumina de LTM dos sítios de enzima de restrição nos amplicons de PCR (Figura 4). A reação de extensão de PCR consistiu em 4 µL de estoque de oligonucleotídeo a 10 µM, 0,5 µL de Pfx DNA polimerase (2,5 U/µL), 5 µL de tampão de Pfx (Invitrogen), 1 µL de dNTP a 10 mM, 1 µL de MgSO₄ a 50 mM e 37,5 µL de dH₂O a 94°C durante 2 min, seguido por 24 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, e 1 min a 68°C e depois incubada por 68°C durante 5 min.

Clonagem do Produto de PCR em um Vetor de Expressão de Célula de Levedura pYD1

[000104] O plasmídeo receptor pYD1 (Figura 6) para a expressão antiovalbumina scFv foi preparado a partir de um hospedeiro de *E. coli* por purificação de plasmídeo (Qiagen), digerindo com as enzimas de restrição, EcoRI e NotI, e no fim desfosforilado com fosfatase alcalina intestinal de bezerro. A ligação do vetor pYD1 e os produtos de SOE-PCR acima (digeridos por EcoRI e NotI), antes da transformação de *E. coli* subsequente (DH5α) realizada usando técnicas-padrão.

Sistema de Expressão de Célula de Levedura

[000105] O pYD1 (Figura 6) é um vetor de expressão designado para exibir proteínas de interesse na superfície extracelular de *Saccharomyces cerevisiae*. Subclonando-se o gene de scFv em pYD1, scFvs tornam-se uma proteína de fusão com o receptor de aglutinina AGA2 permitindo secreção e exibição da superfície celular.

Transformação das Células Hospedeiras de Levedura com Construtos de AGA2-scFv de pYD1

[000106] As células hospedeiras de levedura competentes (500 µl) foram preparadas como pelas instruções do fabricante (Zymo Research Frozen-EZ Yeast Kit). Brevemente, 500 µl de células competentes foram misturados com 10 a 15 µg de DNA da biblioteca de scFv de pYPD1 depois dos quais 5 ml de solução EZ3 foram adicionados. A mistura celular depois foi incubada durante 45 minutos a 30°C com mistura ocasional (três vezes). As células transformadas foram centrifugadas e recolocadas em suspensão em meios de seleção de glicose (Invitrogen).

Indução de AGA2-scFv

[000107] As células foram induzidas depois do crescimento em meios de seleção de glicose a 30°C sob condições de agitação e aeração durante 48 horas até que o $OD_{600} = 7$ ($OD_{600} = 1$ representa 10^7 células/ml). Em particular, as células foram coletadas e recolocadas em suspensão em meios de seleção/indução de galactose (Invitrogen), até que um $OD_{600} = 0,9$ fosse atingido depois de 48 horas a 20°C. A expressão da proteína de fusão Aga2-scFv de pYD1 foi firmemente regulada pelo promotor de GAL1 e depende da galactose disponível no meio para a indução do promotor de GAL1.

Preparação de Ovalbumina Biotinilada

[000108] A biotinilação da ovalbumina de antígeno-alvo foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Molecular Probes FluoReporter Biotin-XX Labeling Kit (cat N° F-2610)). Brevemente, 300 µL de ovalbumina de estoque de 1 mg/mL (Sigma), foram adicionados a 30 µL de Tampão de Bicarbonato de Sódio a 1 M no pH 8,3 e 5,8 µL de solução de Biotina-XX (20 mg/ml de solução de Biotina-XX em DMSO). A mistura depois foi incubada durante 1 hora a 25°C transferida a um tubo de filtro de micron, centrifugada, e a concentração da proteína

foi determinada por absorvância de luz em OD₂₈₀.

Monitoramento de FACS da Expressão de AGA2-scFv e Ligação de Ovalbumina

[000109] Para monitorar a indução e a expressão do construto de scFv, uma alíquota de células de levedura (8×10^5 células em 40 μ L) do meio de cultura foi coletada por centrifugação durante 5 minutos a 2300 rpm. O fluido sobrenadante foi aspirado e depois o pélete celular lavado com 200 μ L de tampão de PBS/BSA resfriado em gelo (PBS/BSA 0,5% em p/v). As células foram repeletizadas e o sobrenadante removido antes da ressuspensão em 100 μ L de tampão contendo a ovalbumina biotinizada (200 nM). As células foram deixadas ligar-se à ovalbumina a 20°C durante 45 minutos depois dos quais elas foram lavadas duas vezes com tampão de PBS/BSA antes da adição e incubação com estreptavidina-FITC (2 mg/L) durante 30 minutos em gelo. Uma outra rodada de lavagem em tampão foi realizada antes da ressuspensão final em um volume de 400 μ L em PBS/BSA. As células depois foram analisadas em FACSscan (Becton Dickinson) usando o pacote de software CellQuest.

EXEMPLO 1

MUTAGÊNESE LOOK-THROUGH MELHORADA PARA O DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS DE AFINIDADE ALTA

[000110] Neste exemplo, a mutagênese look-through melhorada de um anticorpo scFv exemplar é descrita.

[000111] Brevemente, mutagênese look-through melhorada (LTM) foi usada para identificar as mutações de CDR de V_H e de V_L nas regiões de CDR de V_H e de V_L de um anticorpo que realça a afinidade de ligação para um antígeno escolhido, isto é, para identificar os resíduos de aminoácido funcionais (posições) ou zonas quentes que comunicam atividade de ligação. O propósito da mutagênese look-through melhorada (LTM2) é introduzir uma substituição selecionada em

posições alvejadas em uma região de um polipeptídeo, por exemplo, as regiões de CDR da cadeia de anticorpo variável. Inicialmente, as bibliotecas de codificação tanto para as cadeias V_H quanto V_L foram construídas. As sequências de aminoácido das cadeias V_L e V_H do anticorpo antiovalbumina de referência foram identificadas (ver as SEQ ID NOS: 3 a 4) e uma biblioteca de sequências de partida para as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia V_H de antiovalbumina identificada pelas SEQ ID NOS: 5, 6 e 7, respectivamente, e aquelas para as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia V_L identificada pelas SEQ ID NOS: 8, 9, e 10, foram selecionadas. Adicionalmente, cada biblioteca da sequência de codificação de V_H ou de V_L contém mutações para um aminoácido funcional representativo selecionado em uma, duas, ou todas as três CDRs na cadeia selecionada.

[000112] Os aminoácidos predeterminados do segmento de CDR2 de V_H (DINPSNGYTIYNQKFKG) (posições 56 a 69) da seção de V_H de ovalbumina do tipo selvagem SLEWIG-DINPSNGYTIYNQKFKG-FKGKATL, foram selecionados para a análise. As sequências de polipeptídeo SLEWIG e KATLTVD são porções das estruturas de V_H 2 e 3 respectivamente flanqueando CDR2 de V_H . No projeto e na síntese de oligonucleotídeos de LTM de CDR de V_H e de V_L , os comprimentos da sequência de estrutura de flanqueamento de aproximadamente 21 pares de base levam em consideração a sobreposição complementar e SOE-PCR. Um oligonucleotídeo de referência que codifica a sequência de CDR-H2 do tipo selvagem acima (em negrito) (SEQ ID NO: 16) contendo as porções de flanqueamento de V_H2 e V_H3 (letras minúsculas abaixo) é mostrado abaixo:

5'-agc ctt gag tgg att gga-GAT ATT AAT CCT AGC AAT GGT TAT ACT
ATC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC-ttc aag ggc aag gcc aca ttg-
3'

[000113] A LTM de leucina de CDR2 de V_H envolve substituir em série

apenas uma leucina de uma vez, em cada uma ou em uma pluralidade de posições de CDR2. A figura 3 ilustra a aplicação de LTM para introduzir um aminoácido de leucina em cada um dos quatorze resíduos (posições 56 a 69) na região de CDR2 de V_H de antiovalbumina de scFv. Em realizar a LTM de leucina, quatorze oligonucleotídeos separados que codificam todas as variantes posicionais de leucina de CDR2 V_H possíveis foram sintetizadas (SEQ ID NOS: 17 a 33) com cada uma tendo apenas um códon de reposição de leucina (em negrito) limitado pela sequência de antiovalbumina do tipo selvagem. Um total de quatorze peptídeos diferentes depois são gerados, e nenhuma sequência "indesejada" ou de substituição múltipla é produzida.

[000114] Em uma alternativa para introduzir a leucina a uma "pluralidade de posições", uma pessoa pode escolher não incluir um ou mais dos oligonucleotídeos de LTM de CDR2 acima. Consequentemente, por exemplo, os oligonucleotídeos de LTM (SEQ ID NOS: 20 e 21) para as posições 59 e 60 respectivamente podem ser excluídos e assim a mutagênese look-through melhorada (LTM2) apenas seria realizada nas posições 56 a 58 e 61 a 69. Com base nas combinações diferentes de usar uma "pluralidade de posições", as permutações de LTM2 podem ser realizadas sem necessariamente restringir a cada e toda posição dentro de uma CDR.

[000115] O método em fabricar a biblioteca de CDR2 de LTM é resumido nas Figs. 2 e 4. As reações separadas de PCR, T1 e T2, são realizadas usando o FR1 senso (SEQ ID NO: 34) e FR2 antissenso (SEQ ID NO: 35) de pares de iniciadores e os acima oligonucleotídeos de leucina de LTM de CDR-2 mistos (SEQ ID NO: 18 a 33) com o iniciador antissenso FR4 (SEQ ID NO: 36) respectivamente. O FR1 senso do iniciador contém sequências do terminal 5' do gene de ovalbumina e o FR2 antissenso contém a sequência antissenso do terminal 3' da estrutura de ovalbumina 2 de modo que a CDR1 de

ovalbumina, regiões de estrutura 1 e 2 foram amplificadas na reação de PCR T1 (Figs. 2A e 2B). O iniciador FR4 AS contém a sequência antissenso do terminal 3' do gene de ovalbumina, os oligonucleotídeos de LTM de CDR2 contêm as sequências do terminal 5' da região de CDR2 de ovalbumina com as mutações de códon de LTM de CDR2 incorporadas para amplificar a porção remanescente da ovalbumina (fragmento CDR2, FR3, CDR3, FR4 e o segmento de V_L inteiro) enquanto concorrentemente incorporando o(s) códon(s) mutagênico(s). [000116] As mutações de CDR Duplas e Triplas (em combinações diferentes de CDR1, 2, e 3) foram criadas como acima, mas ao invés de usar o gene de ovalbumina do tipo selvagem como um padrão de PCR, uma biblioteca de ovalbumina de LTM previamente gerada foi selecionada. Por exemplo, para criar cadeias V_H em que tanto CDR1 quanto CDR2 são mutadas com a CDR3 do tipo selvagem e segmentos de V_L, os genes mutantes de CDR2 de LTM previamente construídos foram usados como padrões e depois SOE-PCR foi conduzida para incorporar os oligonucleotídeos de CDR1 para gerar as mutações de LTM Dupla (resumido nas Figuras 2 e 4).

[000117] Neste exemplo, a reação de PCR T3 usou o FR1 senso (SEQ ID NO: 34) e FRS antissenso (SEQ ID NO: 37) de pares iniciadores para amplificar a região de estrutura 1 (FR 1). A reação de PCR T4 usou os oligonucleotídeos de histidina de LTM de CDR1 mistos (SEQ ID NO: 38 a 41) com o iniciador antissenso FR4 (SEQ ID NO: 36) para amplificar as porções de FR2, LTM de CDR2, FR3, CDR3, FR4 e V_L remanescentes de ovalbumina (Figura 4). As reações T3 e T4 e PCR depois foram purificadas e alíquotas equimolares de ambas foram combinadas para SOE-PCR (Figura 4) para produzir uma biblioteca de ovalbumina LTM dupla de His CDR1 e Leu CDR2 de scFv. Um conjunto de iniciadores senso de Eco RI 5' específico de extremidade de ovalbumina (SEQ ID NO: 13) e antissenso de NotI 3' de ovalbumina

(SEQ ID NO: 12) depois foram adicionados para facilitar a amplificação e clonagem de ovalbumina de LTM no vetor de expressão pYPDI.

[000118] A biblioteca de LTM dupla de His CDR1 e Leu CDR2 depois foi usada como padrões para incorporar ainda os oligonucleotídeos de CDR3 de LTM para fabricar as bibliotecas de LTM de CDR Tripla. Utilizando-se progressivamente as bibliotecas de LTM única e dupla de partida, um arranjo mais complexo de combinações de biblioteca de LTM tanto na CDR de V_H quanto V_L foi desenvolvido. Por exemplo, uma vez que a biblioteca de CDR1, CDR2, e CDR3 de LTM Tripla de V_H foi construída, projetada como o padrão de biblioteca 111 na linha de topo da figura 5, a introdução de CDR1 de V_L de LTM nos padrões 111 de V_H produz uma biblioteca de 4 CDRs de LTM (Figura 5).

[000119] O gráfico de FACS mostrado na figura 7 ilustra que as moléculas de ligação de scFv de ovalbumina foram geradas na construção da biblioteca precedente. Em particular, as moléculas de ovalbumina biotinilada e estreptavidina FITC (a linha "verde") produziram uma resposta de sinal de pico uma magnitude mais alta comparada ao sinal do vetor pYD1 vazio com ovalbumina biotinilada e estreptavidina FITC (área sombreada escura).

EXEMPLO 2

TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE RENDIMENTO ALTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS COM PROPRIEDADES REALÇADAS

[000120] Neste exemplo, a triagem de rendimento alto de anticorpos exemplares de cadeia simples com propriedades realçadas, é descrita.

[000121] A figura 9 descreve um esquema generalizado para enriquecer os clones de ligação de afinidade alta específicos da ovalbumina a partir da biblioteca de scFv de LTM2 heterogênea. Depois da indução em meio de galactose, a biblioteca de célula de levedura (10^7) foi ressuspensa em tampão de PBS/BSA (volume total de 500 μ L).

A ovalbumina biotinilada foi adicionada à suspensão de levedura para uma concentração final de 50 nM e incubada a 25°C durante 2 a 3 horas com agitação. As células de levedura foram peletizadas, lavadas 3 vezes, e ressuspensas em 300 µL de tampão de PBS/BSA resfriado em gelo de tampão com 1×10^8 contas magnéticas revestidas com estreptavidina adicionadas. A mistura celular de conta foi incubada em gelo durante 2 minutos com mistura suave por inversão para formar um complexo de ligação consistindo em células que expressam scFv com afinidade alta por levedura, ovalbumina biotinilada, e contas magnéticas revestidas com estreptavidina. A coluna (tubos) contendo complexos de ligação depois foi aplicada ao retentor de coluna magnético durante 2 minutos depois dos quais o sobrenadante foi removido por aspiração. A coluna foi removida do retentor magnético, e 300 µL de PBS/BSA resfriado em gelo foram adicionados para ressuspender a ligação. Os complexos de ligação foram lavados novamente de modo a remover aqueles clones de scFv de afinidade baixa e outras células não especificamente ligadas.

[000122] A coluna depois foi removida do retentor magnético depois do que 1 ml de meios de seleção de glicose foi adicionado às células de levedura recuperadas durante uma incubação de 4 horas a 30°C. O retentor magnético depois foi reaplicado ao tubo de cultura para remover quaisquer contas magnéticas remanescentes. A cultura de levedura depois foi cultivada em meios de seleção de glicose a 30°C durante 48 horas antes da indução de scFv em meios de seleção de galactose. Na segunda rodada de seleção, a concentração de ovalbumina depois foi diminuída de 10 nM para 0,5 nM. A ligação de ovalbumina, formação de complexo, e enriquecimento e recrescimento de célula de levedura foram realizados como descrito acima. Para a terceira rodada de seleção final, a concentração de ovalbumina foi mais reduzida para 0,1 nM.

[000123] A ligação de EC50 de ovalbumina, ou "aptidão" de cada uma das rodadas acima de enriquecimento progressivo foi avaliada por FACS (ver A figura 8). Os resultados mostrados na figura 8 ilustram que a biblioteca de levedura de CDR2 de LTM VH inicialmente transformada, sem nenhuma seleção anterior (círculos fechados), assim como a aptidão global em termos de percentagem de aglutinantes (eixo y). Os clones que expressam antiovalbuminas de scFv funcionais e sua afinidade, como medido pela EC50 de ovalbumina (eixo x), foram inferiores comparados ao anticorpo do tipo selvagem antiovalbumina. Entretanto, depois de uma rodada de seleção (10 nM), a curva de "aptidão" (triângulos claros) melhorou no percentual de aglutinantes e a EC₅₀ para a ligação de ovalbumina estava na mesma faixa de nM como a ovalbumina do tipo selvagem. Depois da segunda rodada de seleção (0,1 nM), a população enriquecida (triângulos escuros) exibiu uma "aptidão" global que aproximou-se àquela da ovalbumina do tipo selvagem (quadrados sólidos) (Figura 10). As células de levedura recuperadas da segunda rodada de enriquecimento depois foram plaqueadas em meios sólidos de modo a isolar os clones individuais quanto à análise da ligação individual e determinação de sequência.

[000124] Em uma metodologia alternativa, as bibliotecas de célula de levedura de LTM2 foram enriquecidas quanto aos clones de antiovalbumina de scFv de afinidade alta por FACS. A construção, a transformação, a propagação de meios líquidos e a indução da biblioteca foram realizadas como acima. Depois da indução de scFv, as células foram incubadas com ovalbumina biotinilada em concentrações de saturação (400 nM) durante 3 horas a 25°C. Depois da lavagem das células, uma observação a frio de 40 horas usando ovalbumina não-rotulada (1 µM) a 25°C foi realizada. As células depois foram lavadas duas vezes com tampão de PBS/BSA, rotuladas com anti-HIS-FITC (25 nM) de Estreptavidina PE (2 mg/mL) durante 30 minutos em gelo,

lavadas e ressuspensas como descrito acima para a análise de FACS.

[000125] A antiovalbumina do tipo selvagem foi inicialmente analisada por FACS para fornecer um padrão de sinal de referência para a classificação de FACS da biblioteca de levedura de LTM (Figura 8, painel esquerdo). A partir do gráfico de FACS de ovalbumina, uma porta de seleção (o trapezoide R1) foi esboçada para obter apenas aqueles clones que expressaram a fusão de scFv (como detectado por anti-HIS-FITC) e concomitantemente exibiria uma afinidade de ligação mais alta para a ovalbumina (um sinal de PE mais forte) comparada à antiovalbumina do tipo selvagem. A figura 8 (painel central) demonstra que aproximadamente 5 % da biblioteca de LTM total triada foram selecionados pela porta R1. Depois da coleta por FACS destes clones de antiovalbumina de scFv alto, uma análise de FACS pós classificação (Figura 8, painel direito) foi realizada para confirmar que > 80 % dos clones de antiovalbumina de scFv pré-triagem estavam dentro dos critérios predeterminados. Os clones de scFv classificados por FACS depois foram cultivados em meios de seleção de glicose a 30°C durante 48 horas e plaqueados em meios sólidos para isolar os clones individuais. Os clones depois foram cultivados em meios de seleção de glicose, reinduzidos em meios de seleção de galactose, e analisados quanto a suas características de EC_{50} e/ou k_{off} .

EXEMPLO 3

TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE RENDIMENTO ALTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS COM TAXAS DE K_{off} MELHORADAS

[000126] Neste exemplo, a triagem de rendimento alto de anticorpos exemplares de cadeia simples com taxas de K_{off} realçadas, é descrita.

[000127] Brevemente, os clones pré-classificados do exemplo acima foram cultivados durante a noite em meios de seleção de glicose e depois plaqueados em meios sólidos para isolar as colônias individuais.

A partir das colônias individuais, culturas líquidas de clones foram cultivadas em meios de seleção de glicose a 30°C com agitação durante 48 horas antes da peletização e ressuspensão em meios de seleção de galactose durante o período de tempo OD apropriado. Porque a pré-classificação de FACS enriquece (em aproximadamente 80 %) mas não elimina todos os clones indesejáveis, a EC50 dos clones isolados foi caracterizada para eliminar aquelas que exibem valores de ligação inferiores ao anticorpo antiovalbumina do tipo selvagem de referência (como detalhado acima). Apenas aqueles que isolam com valores de EC50 comparáveis ou superiores depois foram selecionados para outra análise de Koff.

[000128] Um esquema para analisar a cinética das moléculas-candidatos é mostrado na figura 11. Especificamente, as células de levedura (aproximadamente 5×10^6) depois da indução em meios de seleção de galactose, foram peletizadas e ressuspensas em tampão de PBS/BSA (1 mL). A ovalbumina biotinilada (400 nM de concentração final) depois foi adicionada às células ressuspensas e deixada incubar durante 2 horas a 25°C com mistura suave contínua. O complexo de ovalbumina biotinilada e célula de levedura depois foi lavado e ressuspenso em tampão de PBS/BSA e ovalbumina não-rotulada depois foi adicionada (a uma concentração final de 1 μ M) à mistura de célula de levedura que foi mais incubada durante 24 horas a 25°C. As alíquotas de amostra com tempo determinado depois foram tomadas a cada duas horas durante as 24 horas seguintes. As misturas celulares depois foram ressuspensas em suspensão em tampão de PBS/BSA resfriado e marcação com anticorpo α -SA PE (2 μ g/mL). Depois da incubação durante 30 minutos em gelo com mistura periódica, a mistura celular depois foi lavada duas vezes e analisada por FACS como acima.

[000129] Os resultados dos ensaios de K_{off} (Figura 12) demonstraram dois clones (isto é, 3ss-35; 3ss-30) como tendo uma k_{off} relativa mais

alta quando comparada ao anticorpo antiovalbumina do tipo selvagem. Em outras palavras, quando trocando a ovalbumina biotinilada ligada pela ovalbumina não-rotulada durante o período de amostragem de 24 horas, 3ss-35 e 3ss-30 liberou a ovalbumina biotinilada previamente ligada em uma taxa muito mais lenta (círculos e triângulos respectivamente na figura 12) comparada à antiovalbumina do tipo selvagem, (quadrados na figura 12) que exibiu uma diminuição muito mais acentuada em MFI (intensidade de fluorescência média) durante as primeiras 8 horas.

EXEMPLO 4

TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE RENDIMENTO ALTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS COM LIGAÇÃO DE EC₅₀ MELHORADA

[000130] Neste exemplo, a triagem de rendimento alto dos anticorpos exemplares de cadeia simples com atividade de ligação de EC₅₀ realçada é descrita.

[000131] Brevemente, uma quantidade predeterminada de células de levedura (8×10^5 células em 40 μ l) scFvs de antiovalbumina (tipo selvagem e biblioteca de LTM) foi incubada com 1:4 diluições seriais de ovalbumina biotinilada (concentrações finais de 200 nM, 50 nM, 12,5 nM, 3,1 nM, 0,78 nM, e 0,19 nM em um volume total de 80 μ l) a 20°C durante 45 minutos seguido por 5 a 10 minutos em gelo. As células de levedura depois foram lavadas e recolocadas em suspensão em 5 ml de tampão de PBS/BSA depois dos quais estreptavidina-PE (2 mg/ml) e α HIS-FITC (25 nM) foram adicionadas para rotular as células durante uma incubação de 30 minutos em gelo. Uma outra rodada de lavagem foi realizada antes da recolocação em suspensão em 400 μ l de tampão de PBS/BSA e análise em FACSscan usando o software CellQuest.

[000132] A figura 13 exemplifica um subconjunto de clones melhorados, em relação à antiovalbumina, tendo valores de EC₅₀ mais

baixos (as curvas de ligação têm deslocado para a esquerda com respeito ao tipo selvagem). Estes valores de EC_{50} relativos quando comparados à antiovalbumina do tipo selvagem e o aumento da duplicação relativo são mostrados. Por exemplo, o clone H3 S101Q exibiu uma melhora de 2,1 vezes na ligação de ovalbumina. A identificação da nomenclatura deste clone H3 S101Q indica que ele foi de uma biblioteca única de LTM de glutamina de CDR3 VH.

[000133] Os anticorpos com afinidade de ligação realçada resultantes produzidos fornecem um mapa de mutações de aminoácido benéficas nas CDRs de VH e de VL do anticorpo antiovalbumina que foram associados com a atividade de ligação realçada. As mutações de CDR de VH e de VL de aminoácido individual putativas associadas com os scFvs de anticorpo de afinidade realçada são mostradas na figura 13. As mutações foram encontradas em cada mutação de CDR VH e de VL e de CRD única, dupla, e tripla de, e incluem cada um dos nove aminoácidos diferentes testados. A figura 13 exemplifica que para os clones de VH CDR-H3 H3 G102K independentes identificados da triagem de EC_{50} e/ou cinética (Koff) acima, podem ser recuperados. O mutante de LTM VL L1L2 S166H S193H duplo da triagem de EC_{50} (Figura 14) também ilustra que a ligação de ovalbumina realçada ocorre quando existe uma interação sinérgica entre estas duas substituições de CDR1 S166H e CDR2 S193H.

[000134] Os resultados também indicam que (ver A figura 14) as únicas sequências para os anticorpos antiovalbumina de scFv selecionados de acordo com o método de EC_{50} e/ou Koff acima usando sequências de codificação contendo mutações únicas em uma, duas ou em todas as três CDRs nas cadeias V_H ou V_L , podem ser obtidas. Algumas das substituições de aminoácido foram descobertas ser recuperadas em uma preponderância mais alta em certas CDRs. Por exemplo na CDR1 de V_H , existiram sete substituições de Lys únicas

independentes nas posições D30K, Y31K, M33K e W35K. A preponderância alta de Lys em CDR1 indica que a ligação de ovalbumina realçada ocorre quando existe um aumento livre de cargas positivas contribuído por CDR1 durante o contato antigênico. O exame das substituições de aminoácido recuperadas também revelou que uma substituição favorecida ocorre para CDR2 e CDR3 de V_H. Por exemplo, foi observado que as substituições de Lys múltiplas dispersas ocorrem em CDR2 enquanto que CDR3 exibe substituições de G102K e G104K concentradas. Os resultados também revelam que adicionalmente, existiram substituições de Gln múltiplas, um outro aminoácido polar, em CDR3 nas posições 107, 108, 109, e 111. Estes resultados indicam que existe um único "motivo químico" de cargas negativas e/ou hidrofílicas correspondentes na ovalbumina que é contatada por estes resíduos de CDR substituídos.

[000135] Consequentemente, as mutações da ligação de antígeno realçada recuperadas em cada CDR depois da mutagênese de todas as CDRs por cada um dos nove aminoácidos diferentes testados foram arranjadas e os resultados são mostrados na figura 14. Cada CDR foi determinada para também exibir pelo menos uma posição em que nenhuma mutação foi encontrada, por exemplo, posições Ile57, Asn58, e G11y62 de CDR2 de V_H, posições Tyr103, Ser105, Arg106 e Ala121 da região CDR3 de V_H. Para as posições de V_L; R164, A165, V169 e N174 de CDR1, N194 de CDR2, E208 e D209 de CDR3 foram descobertas não ser substituídas depois da triagem extensiva. Estes resultados indicam que além das posições de substituição da "zona quente" e qualquer tipo de aminoácido preferido recuperado como descrito acima, também existem posições de CDR da "zona fria". As posições da "zona fria" indicam que qualquer uma das substituições não confere nenhuma vantagem de ligação de antígeno ou propriedade de ligação inferior comunicada.

EXEMPLO 5MÉTODOS PARA CONDUZIR MUTAGÊNESE BENÉFICA COMBINATÓRIA

[000136] Neste exemplo, os métodos para conduzir a mutagênese benéfica combinatória são descritos.

[000137] Brevemente, o método incorpora as mutações benéficas encontradas usando LTM, e combina-as juntas em uma única biblioteca. Portanto, os efeitos sinérgicos de mutações múltiplas podem ser explorados neste processo. Este método combinatório é parecido com o método de WTM exceto que as substituições de códon selecionadas dentro das CDRs são as substituições de aminoácido benéficas diferentes identificadas por LTM. Assim, nem toda posição de resíduo em uma CDR de anticorpo conterá uma mutação, e algumas posições terão aminoácidos diferentes múltiplos substituídos nesta posição. Em toda parte, muitas se não todas, combinações de mutações benéficas dentro de uma CDR ou uma cadeia de anticorpo serão representadas por pelo menos uma das sequências de codificação na biblioteca. Como será observado abaixo, esta biblioteca de sequência de codificação pode ser preparada por uma modificação do método de WTM, exceto que ao invés de colocar códons para um único aminoácido em cada posição diferente na região de codificação variável, os códons que são introduzidos são aqueles que correspondem a todas as mutações benéficas detectadas no método de LTM.

[000138] Neste exemplo, uma biblioteca de CDR1 de cadeia pesada benéfica combinatória é construída usando as variantes de antioalbumina melhoradas descritas na figura 14. A primeira posição de aminoácido 30 codifica (no mínimo) Asp (tipo selvagem) e Lys; posição 31, Tyr e Lys; posição 32 Asn e Tyr; posição 33 Met, His e Lys; posição 34 Asp e Pro; posição 35 Trp e Lys. A sequência de DNA é representada por um oligonucleotídeo de CDR1 degenerado que

incorpora as mutações benéficas combinatórias identificadas a partir da análise de LTM (Tabela 1).

Tabela 1 Possibilidades da base de nucleotídeo de 5' a 3'

5'	G	A	C	T	A	C	A	A	C	A	T	G	G	A	C	T	G	G	3'
	A		G	A		G	T			C	A	C	C	C		A	A	G	

[000139] Um processo similar pode ser realizado com todas as alças de CDR para produzir uma biblioteca benéfica de 6-CDR, ou sub-bibliotecas podem ser produzidas e triadas em combinação. Por exemplo, se o tamanho da biblioteca for muito grande para ser triado em uma única biblioteca, então as sub-bibliotecas podem ser produzidas. Por exemplo, uma biblioteca de cadeia pesada de 3-CDR e uma biblioteca de cadeia leve de 3-CDR podem ser produzidas para eficiências maiores. Depois da triagem, as mutações benéficas das bibliotecas de cadeia pesada e leve podem ser combinadas ainda em uma única biblioteca que incorpora mutações nas alças apropriadas.

Equivalentes

[000140] Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de apurar usando não mais do que a experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descritas aqui. Tais equivalentes são intencionados a ser abrangidos pelas reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de distinguir um ou mais resíduos de aminoácido funcionais dos resíduos de aminoácido não-funcionais em uma região definida dentro de um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende,

selecionar um ou mais resíduos de aminoácido dentro da sequência de aminoácido do polipeptídeo;

determinar um resíduo de aminoácido a ser substituído por um ou mais resíduos de aminoácido selecionados;

sintetizar polinucleotídeos que codificam o polipeptídeo ou porção deste compreendendo os resíduos de aminoácido selecionados, os polinucleotídeos coletivamente representando substituições de aminoácido variante possíveis de acordo com os seguintes critérios:

i) cada polinucleotídeo contendo em cada posição do códon na região definida, um códon necessário para a síntese do resíduo de aminoácido do polipeptídeo ou um códon para um dos resíduos de aminoácido predeterminado, e

ii) cada polinucleotídeo contendo não mais do que um códon para o resíduo de aminoácido predeterminado,

gerando deste modo uma biblioteca de expressão contendo os polinucleotídeos como definido em i) e ii);

expressar a biblioteca de expressão para produzir análogos de polipeptídeo; e

triar os análogos de polipeptídeo quanto a uma alteração em uma propriedade mensurável tal que um ou mais resíduos de aminoácido dentro do polipeptídeo, ou porção destes, são identificados como contribuindo para a propriedade mensurável e portanto distinguido de um resíduo de aminoácido não-funcional, em que os resíduos de aminoácidos identificados como contribuintes para uma propriedade mensurável são determinados como adequados para

mutagênese e os resíduos não funcionais são determinados como inadequados para mutagênese e em que um ou mais resíduos de aminoácidos funcionais são exclusivamente mutagenizados.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um anticorpo ou fragmento deste.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um anticorpo de cadeia única (sFVs).

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda a etapa de identificar um polinucleotídeo que codifica um análogo de polipeptídeo selecionado tendo uma alteração em uma propriedade mensurável.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a alteração em uma propriedade mensurável é uma propriedade realçada tal como uma ligação de antígeno de afinidade alta ou uma função efetora melhorada.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o antígeno é um alvo terapêutico em uma doença ou distúrbio humanos.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a triagem compreende,

contatar um polipeptídeo com um substrato-alvo, o polipeptídeo estando associado com o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo, o polinucleotídeo ou polipeptídeo estando associados com uma porção detectável, tal que um polipeptídeo variante capaz de ligar-se a um substrato-alvo é detectado e deste modo identificado como codificado pelo polinucleotídeo.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo está associado com o análogo de polipeptídeo usando a exibição de expressão selecionada do grupo consistindo em exibição de ribossomo, exibição de polissoma, exibição

de fago, exibição procariótica (bacteriana), exibição de levedura, exibição de célula eucariótica, e exibição de biblioteca arranjada.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região definida compreende um domínio funcional do polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em sítio de ligação do anticorpo ou porção do mesmo, uma região estrutural do anticorpo, uma região efetora do anticorpo, um sítio de ligação ao receptor e um sítio catalítico.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o sítio de ligação do anticorpo ou porção do mesmo compreende um domínio de CDR porção desta selecionada do grupo consistindo em CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5, CDR6 e uma combinação destas, a região de estrutura de anticorpo compreende um domínio selecionado do grupo consistindo em FR1, FR2, FR3, FR4 e uma combinação destes e uma região efetora de anticorpo compreendendo um domínio selecionado do grupo consistindo em um sítio de ligação de complemento e uma região de ligação do receptor Fc.

11. Método de gerar uma biblioteca de análogos de polipeptídeo em que um aminoácido predeterminado aparece em uma ou mais posições de aminoácido funcionais em uma região definida do polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende:

selecionar uma ou mais posições de aminoácido funcionais, como definida na reivindicação 1, em uma região definida da sequência de aminoácido do polipeptídeo;

determinar um resíduo de aminoácido a ser substituído em cada posição de aminoácido funcional dentro da região definida;

sintetizar os polinucleotídeos individuais que codificam a região definida, os polinucleotídeos coletivamente representando os polinucleotídeos variantes possíveis de acordo com os seguintes

critérios:

i) cada polinucleotídeo contendo em cada posição do códon de aminoácido funcional na região definida, um códon necessário para o resíduo de aminoácido do polipeptídeo ou um códon para o resíduo de aminoácido predeterminado, e

ii) cada polinucleotídeo contendo não mais do que um códon para o resíduo de aminoácido predeterminado,

gerando deste modo uma biblioteca de polinucleotídeos em que o resíduo de aminoácido predeterminado aparece em cada posição de aminoácido funcional dentro da região definida.

12. Método de identificar um subconjunto de análogos de polipeptídeo tendo uma propriedade desejada, caracterizado pelo fato de que compreende:

selecionar um ou mais aminoácidos funcionais como definidos na reivindicação 1 dentro de uma região definida da sequência de aminoácido do polipeptídeo;

determinar um resíduo de aminoácido a ser substituído em cada posição de aminoácido funcional dentro da região definida;

sintetizar os polinucleotídeos que codificam a região definida, os ditos polinucleotídeos representando coletivamente os polinucleotídeos variantes possíveis de acordo com os seguintes critérios:

i) cada polinucleotídeo contendo em cada posição do códon na região definida, um códon necessário para a síntese do resíduo de aminoácido do polipeptídeo ou um códon para o resíduo de aminoácido predeterminado, e

ii) cada polinucleotídeo contendo não mais do que um códon para o resíduo de aminoácido predeterminado,

gerando deste modo uma biblioteca de expressão contendo os polinucleotídeos; expondo a biblioteca de expressão às condições

sob as quais a biblioteca é expressada;

triar a biblioteca expressada para identificar um polipeptídeo tendo uma propriedade desejada;

comparar a propriedade do polipeptídeo quando comparado a um critério de controle, em que um polipeptídeo que corresponde ou excede o critério de controle é categorizado como um respondedor e um polipeptídeo que falha no critério de controle é categorizado como um não-respondedor;

categorizar os respondedores e não-respondedores em uma base de dados; e

examinar a base de dados para determinar a sequência de um subconjunto de polipeptídeos a ser sintetizado.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das etapas acima é auxiliada por computador.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a propriedade é selecionada do grupo consistindo em uma especificidade de ligação alterada, um índice de associação de ligação alterada (k_{on}), um índice de dissociação de ligação alterada (k_{off}), e combinações destes.

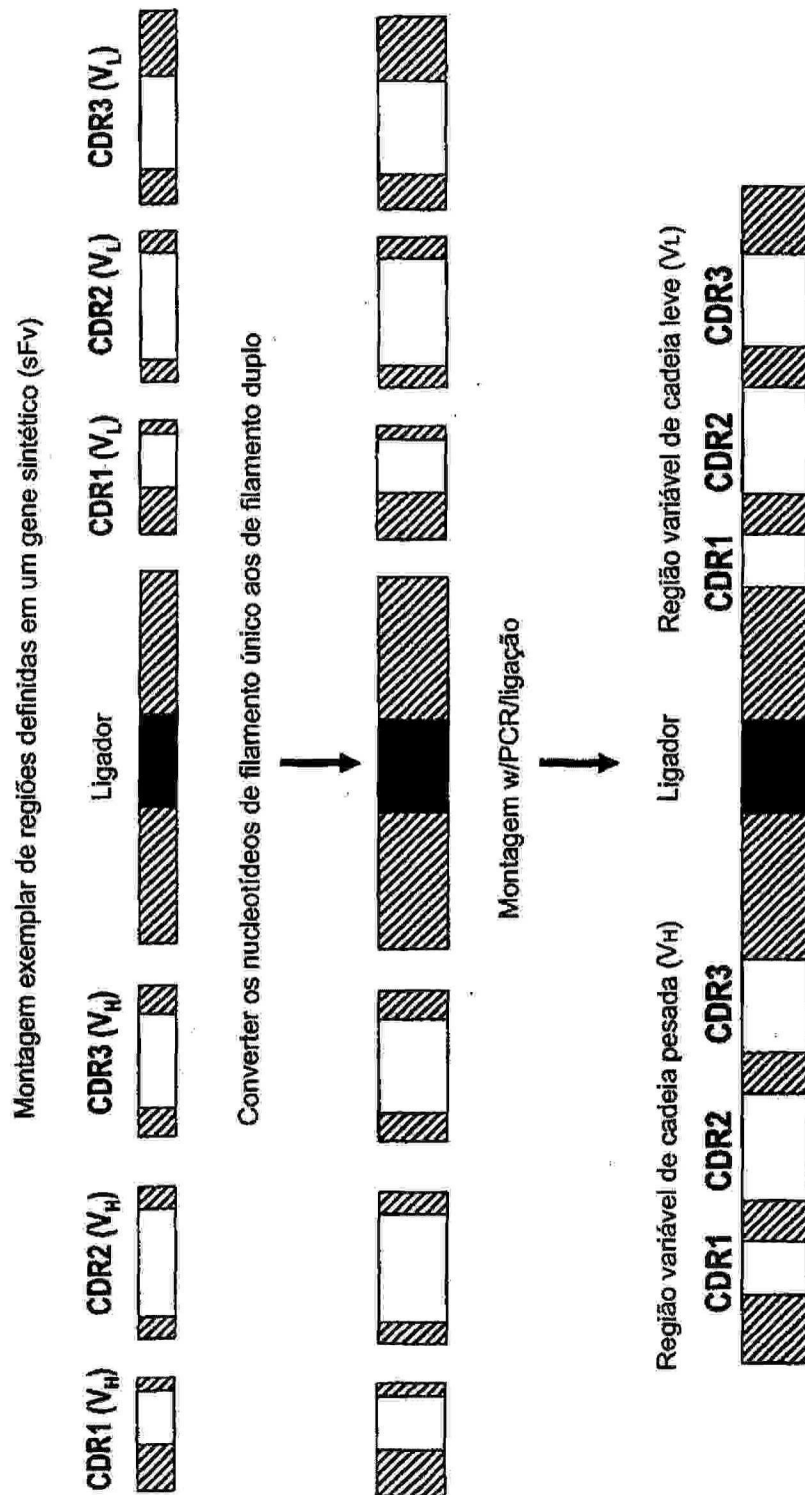


Fig. 2

Fig. 3

LTM de CDR H2 de anticorpo de cadeia simples anti-ovalbumina (scFv)
 Região variável de cadeia pesada (V_H) Região variável de cadeia leve (V_L)
 CDR1 CDR2 CDR3 CDR1 CDR2 CDR3

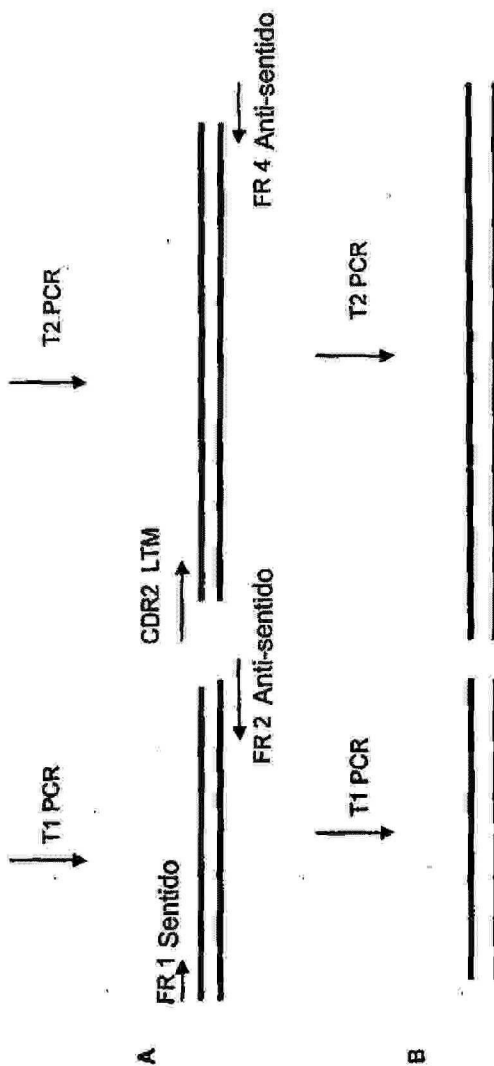


Sequência de CDR H2 do tipo selvagem

56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
D	I	N	P	S	N	G	Y	T	I	Y	N	Q	K
●	I	N	P	S	N	G	Y	T	I	Y	N	Q	K
D	●	N	P	S	N	G	Y	T	I	Y	N	Q	K
D	I	●	P	S	N	G	Y	T	I	Y	N	Q	K
D	I	N	●	S	N	G	Y	T	I	Y	N	Q	K
D	I	N	P	●	N	G	Y	T	I	Y	N	Q	K
D	I	N	P	S	●	G	Y	T	I	Y	N	Q	K
D	I	N	P	S	N	●	Y	T	I	Y	N	Q	K
D	I	N	P	S	N	G	●	T	I	Y	N	Q	K
D	I	N	P	S	N	G	Y	●	I	Y	N	Q	K
D	I	N	P	S	N	G	Y	T	●	Y	N	Q	K
D	I	N	P	S	N	G	Y	T	I	●	N	Q	K
D	I	N	P	S	N	G	Y	T	I	Y	●	Q	K
D	I	N	P	S	N	G	Y	T	I	Y	N	●	K
D	I	N	P	S	N	G	Y	T	I	Y	N	Q	●

Sequências de CDR H2 de LTM de Leu

SOE-PCR de LTM de CDR2 de um anticorpo de cadeia simples anti-ovalbumina (scFv)



5'-----FR 2 -----cat ctc acc caa aga cgc tct----->3'
 3-<-----'-gta gag tgg gtt tct tct gcg ata----- CDR2 LTM ----5'

Fig. 4A

SOE-PCR de LTM de CDR1 de um padrão de scFv para fabricar uma biblioteca de LTM de CDR1 e CDR2 dupla

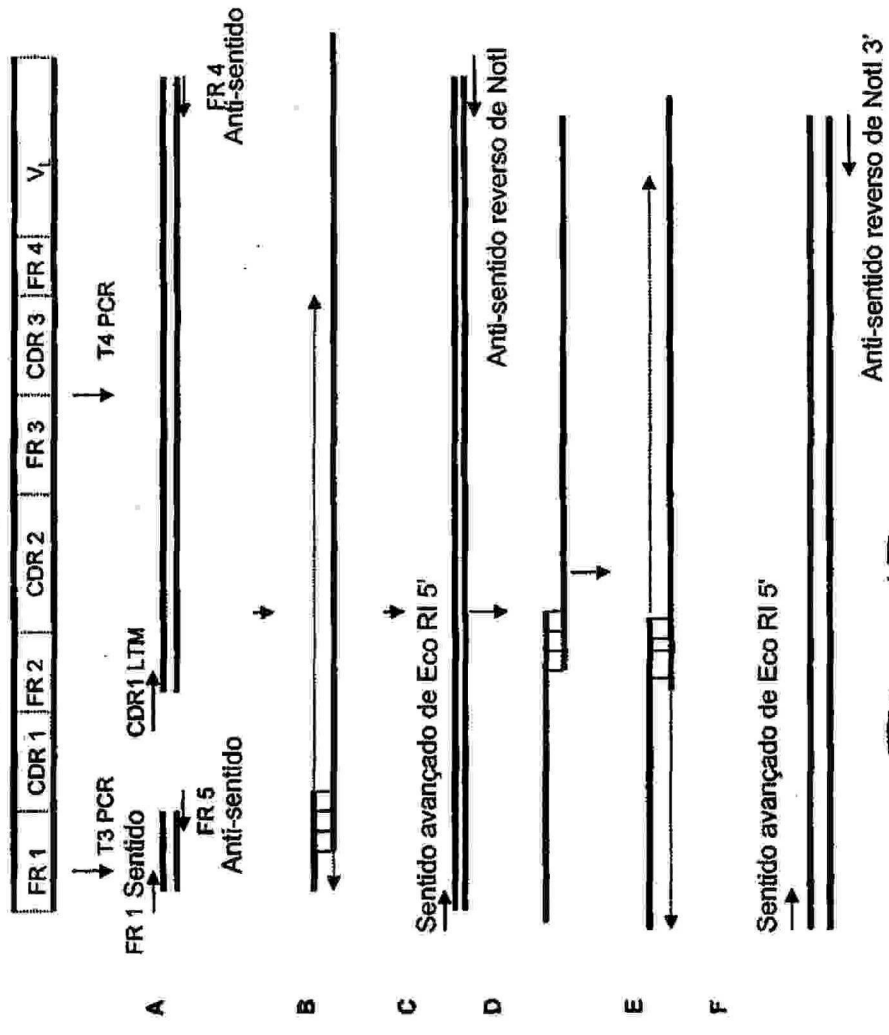


Fig. 4B

Matriz que mostra permutações de mutagênese de CDR de cadeia leve e pesada combinadas

	000	100	010	001	110	101	011	111
CDRs de cadeia leve		1	1	1	2	2	2	3
000		1	1	1	2	2	2	3
100	1	2	2	2	3	3	3	4
010	1	2	2	2	3	3	3	4
001	1	2	2	2	3	3	3	4
110	2	3	3	3	4	4	4	5
101	2	3	3	3	4	4	4	5
011	2	3	3	3	4	4	4	5
111	3	4	4	4	5	5	5	6

CDRs de cadeia pesada

Fig. 5

Esquemática do cassete de expressão, exibição, e triagem de levedura de anticorpo de cadeia simples (scFv)



Fig. 6

8/15

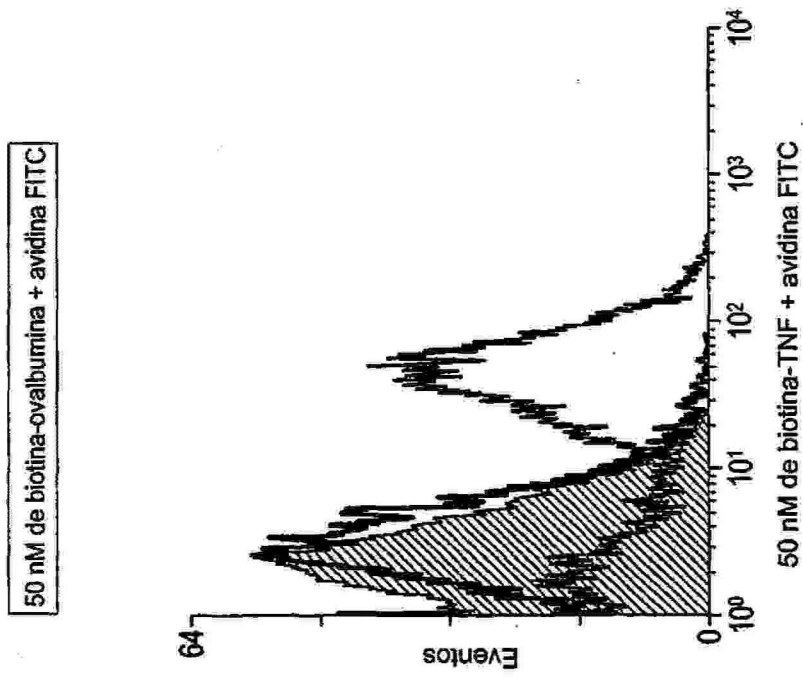


Fig. 7

9/15

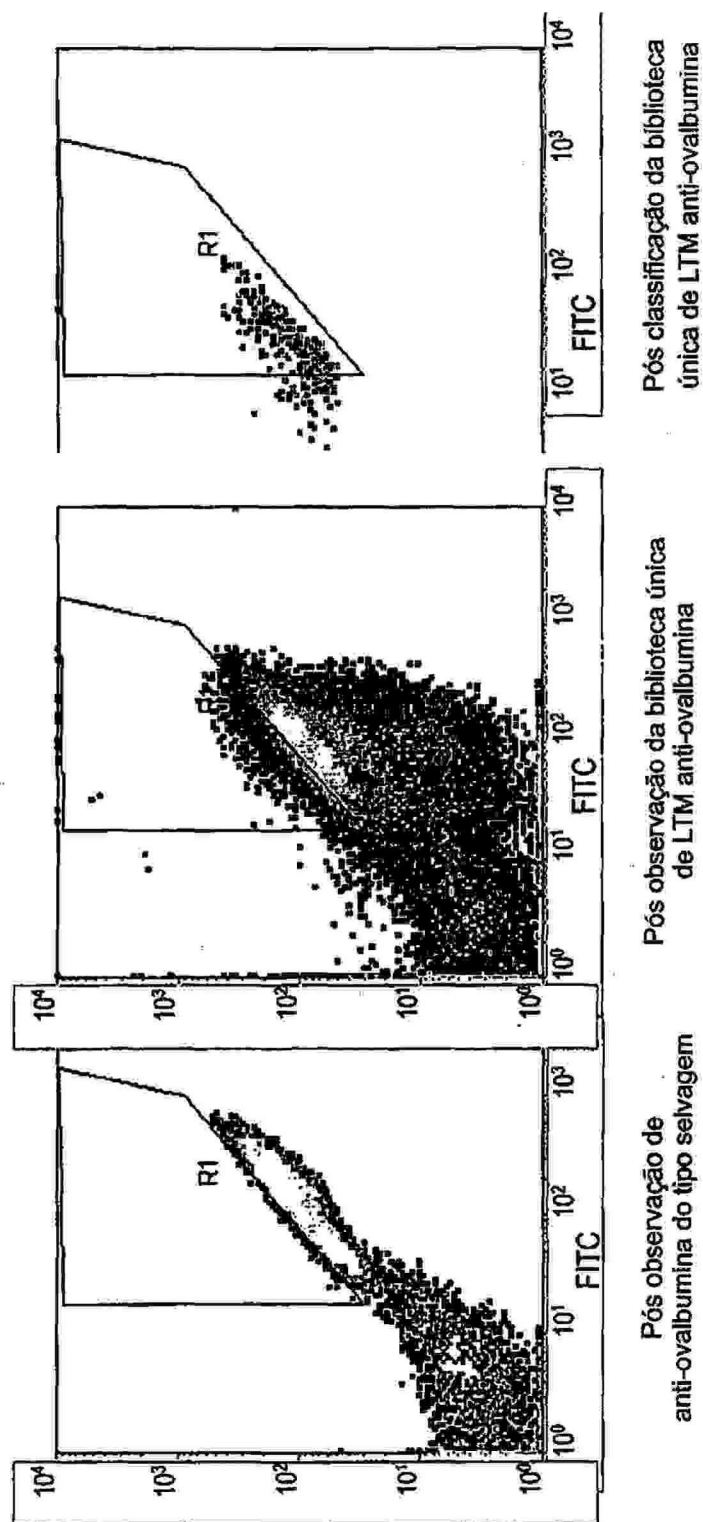


Fig. 8

Configuração da seleção em equilíbrio para a classificação magnética da ligação de ovalbumina

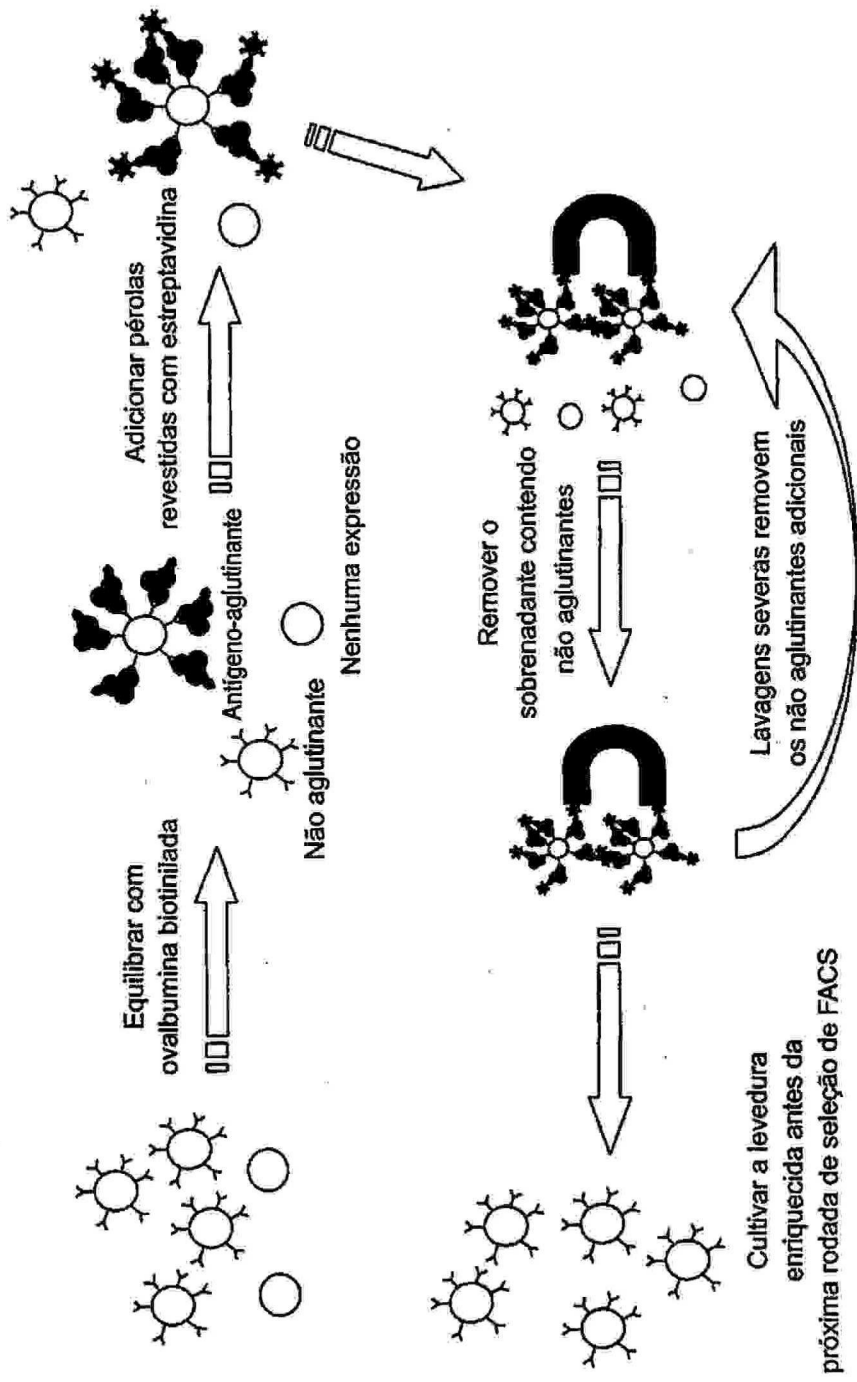
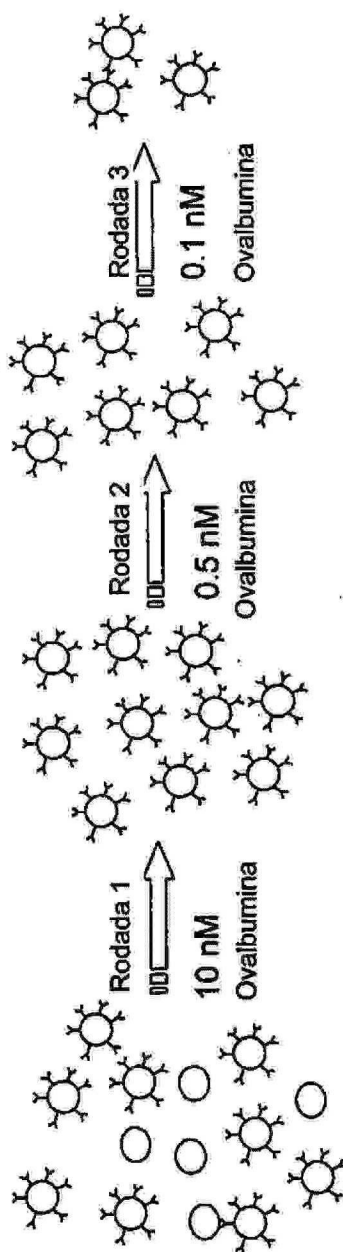


Fig. 9

Esquema de seleção da biblioteca de anti-ovalbumina de LTM de CDR2 de V_H para aumentar a "afidão" da biblioteca com cada rodada de seleção



- Anti-ovalbumina do tipo selvagem
- ▲ VH CRD2 0.1 nM Rodada 2
- ▼ VH CRD2 10 nM Rodada 1
- VH CRD2 Nenhuma seleção

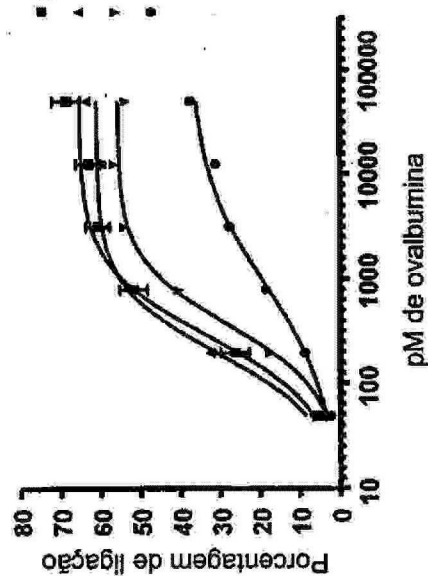


Fig. 10

Esquema de seleção para selecionar a cinética de ligação melhorada (k_{on})

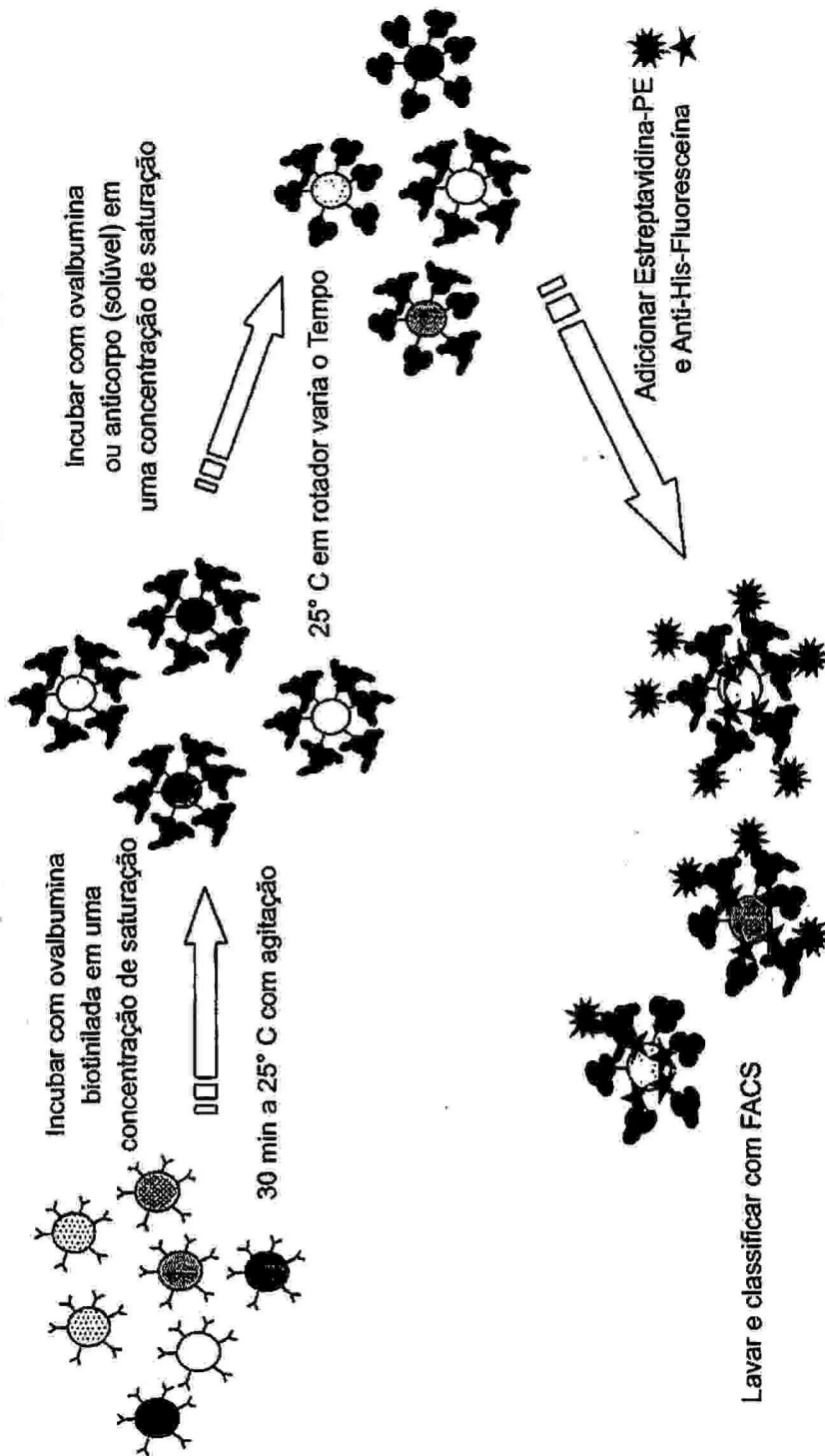


Fig. 11

Resultados do ensaio de cinética (k_{rel}) para variantes de anticorpo melhoradas usando exibição de levedura

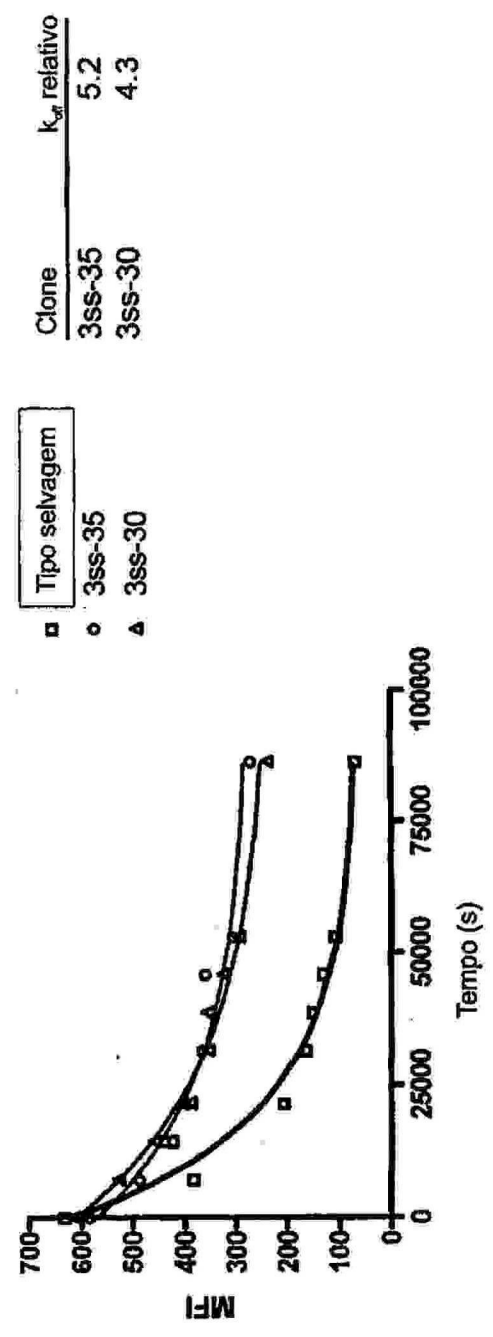


Fig. 12

Um subconjunto de variantes de anti-ovalbumina melhoradas selecionado de bibliotecas de LTM

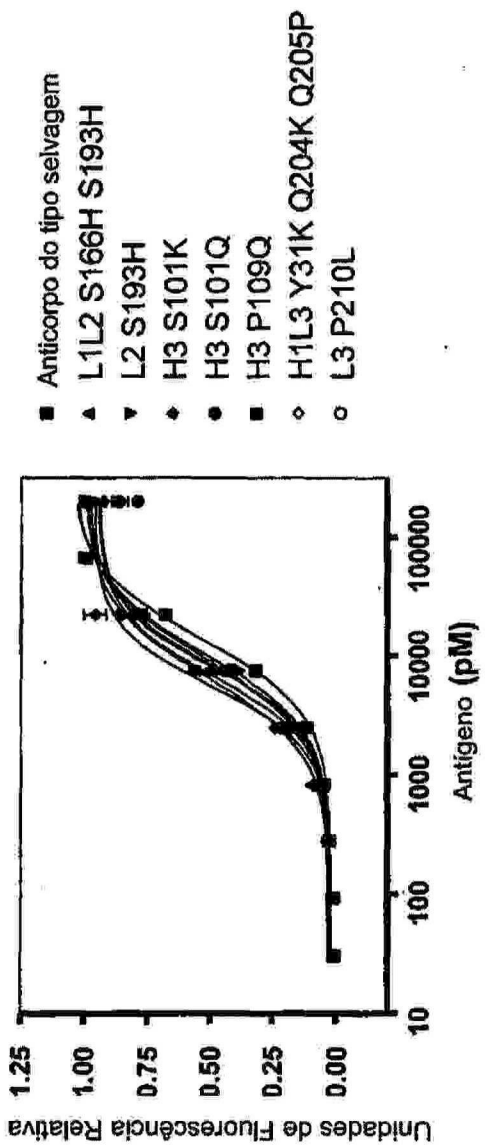


Tabela 1	Anti-ovalbumina WT	L1L2 S166H S193H	L2 S193H	H3 S101K	H3 S101Q	H3 P109Q	H1L3 Y31K Q204K Q205P	L3 P210L
EC ₅₀ relativa	1.0	0.47	0.72	0.40	0.48	0.71	0.61	0.57
Duplicação melhor do que WT		4.0	1.4	2.5	2.1	1.4	2.9	1.7

Fig. 13

Variantes de anti-ovalbumina melhoradas selecionadas de bibliotecas de LTM

[illegible][illegible]

Fig. 14