

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 189**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06700177 .6**  
96 Fecha de presentación: **05.01.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1833965**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **Método de presentación de ribosomas o presentación en mRNA con selección en cuanto a una estabilidad aumentada de la proteína**

30 Prioridad:  
**05.01.2005 GB 0500099**  
**05.01.2005 US 642209 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2012**

73 Titular/es:  
**MEDIMMUNE LIMITED**  
**MILSTEIN BUILDING GRANTA PARK**  
**CAMBRIDGE CAMBRIDGESHIRE CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:  
**BUCHANAN, Andrew y**  
**JERMUTUS, Lutz**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 379 189 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de presentación en ribosomas o presentación en mRNA con selección en cuanto a una estabilidad aumentada de la proteína

5 El presente invento se refiere a métodos para seleccionar, obtener o producir variantes polipeptídicas con una estabilidad mejorada. También se refiere a la fabricación y el uso de las variantes después de la selección, tal como, por ejemplo, en terapia.

10 En el invento se emplea una tecnología de presentación que lleva incorporada traducción *in vitro* y enlace no covalente entre el genotipo, tal como RNA, y el fenotipo codificado, tal como un polipéptido de interés, para seleccionar variantes polipeptídicas que tengan una estabilidad mejorada en comparación con un polipéptido parental y que conserven su actividad funcional.

15 La presentación y selección en ribosomas o polisomas implica la construcción de bancos de ácido nucleico, exploración en cuanto a la unión, e identificación de elementos ligantes de interés. El banco se prepara sintetizando una colección de diversas secuencias de DNA que son luego transcritas para producir una colección de mRNAs. Se utiliza la traducción *in vitro* para generar los polipéptidos o proteínas codificados presentados, y se seleccionan las interacciones ligantes deseables utilizando un antígeno diana inmovilizado. El mRNA que codifica los elementos ligantes puede ser utilizado para preparar cDNA, el cual puede ser luego multiplicado, y se puede repetir el proceso para enriquecer la población en cuanto a genes que codifican agentes ligantes. Las proteínas seleccionadas pueden ser identificadas más tarde mediante clonación de secuencias de codificación individuales y secuenciación de DNA.

20 Esta tecnología ha sido ampliamente revisada [Hanes et al. (2000), Meth. Enzymol. 328, 403-430; Plückthun et al. (2000), Adv. Prot. Chem. 55, 367-403; Lipovsek y Plückthun (2004), J. Immunological Methods 290, 51-67].

Esta tecnología ha sido utilizada para la presentación de fragmentos de anticuerpo, péptidos y diversas proteínas, incluyendo proteínas periplásmicas y citoplásmicas tales como  $\beta$ -lactamasa y proteínas con repeticiones de anquirina.

25 La recuperación de mRNA de complejos polisómicos fue comunicada por vez primera en 1973 en un artículo en que se describía un protocolo para capturar un mRNA que codificaba una cadena L de inmunoglobulina de ratón, usando anticuerpos y oligotimidina inmovilizada [Schechter (1973), PNAS USA 70, 2256-2260]. Payvar y Schimke [Eur. J. Biochem. (1979) 101, 271-282] realizaron mejoras a los protocolos para inmunoprecipitación de polisomas y, después de la inmunoprecipitación de polisomas usando un anticuerpo monoclonal, se obtuvieron clones de cDNA para la cadena pesada de antígenos HLA-DR [PNAS USA (1982) 79, 1844-1848]. Kawasaki (Patente de EE.UU. n° 5.643.768 y Patente de EE.UU. n° 5.658.754, EP-B-0494955) propuso y patentó la producción de bancos de anticuerpos mediante presentación en ribosomas.

35 Ha habido diversos ejemplos sobre el uso de presentación en ribosomas utilizando sistemas de traducción eucarióticos o procarióticos. La primera demostración de la selección de ligandos peptídicos usando un extracto de *E. coli* fue realizada por Mattheakis et al. [PNAS USA (1994) 91, 9022-9026 y Methods Enzymol. (1996) 267, 195-207]. Este grupo demostró la selección de ligandos peptídicos que son similares a epítopos peptídicos conocidos de un anticuerpo dado, utilizando el anticuerpo como un sustrato de selección. Se han identificado ligandos peptídicos de alta afinidad que se unen al antígeno específico de la próstata, utilizando la selección en polisomas a partir de bancos peptídicos usando un sistema de traducción de extracto de germen de trigo [Gersuk et al. (1997), Biotech. and Biophys. Res. Comm. 232, 578-582]. Se comunicó la selección de fragmentos de anticuerpo funcionales usando un sistema de traducción de *E. coli* diseñado para la producción aumentada de complejos ternarios y permitiendo la formación de enlaces disulfuro [Hanes y Pluckthun, PNAS USA (1997) 94, 4937-4942]. Este proyecto experimental ha sido posteriormente utilizado para seleccionar anticuerpos de un banco murino, y se mostró que tiene lugar una maduración de la afinidad durante la selección debido al efecto combinado de errores de PCR y selección. Se obtuvo un fragmento scFv con una constante de disociación de aproximadamente  $10^{-11}$  M [Hanes et al., PNAS USA (1998) 95, 14.130-50]. También se ha demostrado el enriquecimiento en anticuerpos específicos a partir de poblaciones mixtas usando extractos de lisados de reticulocitos de conejo [He y Taussig (1997) NAR, 5132-5234].

50 El presente invento proporciona una metodología que es aplicable a la tecnología de presentación que lleva incorporada traducción *in vitro* y enlace no covalente entre el genotipo, tal como RNA, y el fenotipo codificado, tal como un polipéptido de interés, para la selección de variantes del polipéptido objetivo con una estabilidad mejorada y una funcionalidad conservada en comparación con un polipéptido parental. Los métodos del invento llevan incorporadas diversas características no previamente utilizadas conjuntamente en la presentación en ribosomas.

En realizaciones del presente invento, se emplean simultáneamente dos o más presiones de selección en cuanto a estabilidad, lo que permite la selección de polipéptidos estables como se expone en las reivindicaciones.

55 Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede ser cualquier factor que se pueda utilizar en una tecnología de presentación que lleva incorporada traducción *in vitro* y enlace no covalente entre el genotipo, tal como RNA, y el fenotipo codificado, tal como un polipéptido de interés, que permita la selección de un polipéptido variante en lo relativo a su estabilidad. La estabilidad puede ser generalmente definida como la tendencia de una molécula a existir

en su estado plegado y activo. Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede alterar o evitar una plegadura polipeptídica correcta, de modo que no se alcance un estado activo o completamente activo. Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede afectar a la capacidad de un polipéptido para permanecer en su estado plegado y activo. Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede permitir diferenciar en cierto modo entre polipéptidos que están en un estado plegado y activo y aquellos que no lo están.

Por ejemplo, una presión de selección en cuanto a estabilidad puede ser un agente desnaturizante químico, tal como urea, guanidina HCl (GuHCl) o tiocianato, por ejemplo, tiocianato sódico. Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede ser un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT), hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), mercaptoetanol o glutatión. Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede ser un agente desnaturizante físico, tal como el pH o la temperatura, en particular una temperatura aumentada. Una presión de selección puede ser una proteasa o una enzima capaz de degradar proteínas. Una presión de selección puede ser la disminución de chaperones, o los pequeños inhibidores moleculares de la plegadura de proteínas.

Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede ser el uso de cromatografía por interacción hidrófoba (HIC; del inglés, *hydrophobic interaction chromatography*).

La cromatografía por interacción hidrófoba (HIC) es una técnica para la separación de biomoléculas basada en diferencias en su hidrofobia superficial. Se han utilizado técnicas de HIC como parte de estrategias para purificación de proteínas y también como una herramienta analítica para la detección de cambios conformacionales en proteínas [revisadas por Queiroz et al. (2001), *J. Biotech.* 87, 143-159; Fulton y Vanderburgh (1996), *Biomolecule Chromatography PerSeptive Biosystems*]. La HIC se basa en una atracción hidrófoba entre la matriz para HIC y las moléculas proteicas. La matriz para HIC consiste en pequeños grupos apolares (butilo, octilo o fenilo) fijados a una estructura polímera hidrófila (por ejemplo, agarosa o dextrano reticulados). Muchas proteínas, que generalmente son consideradas hidrófilas, tienen también números suficientes de grupos hidrófobos que permiten la interacción con la matriz para HIC. La HIC es lo suficientemente sensible para detectar la interacción con grupos apolares normalmente enterrados dentro de la estructura terciaria de la proteína pero expuestos a causa de una plegadura incorrecta. La intensidad de la interacción depende del tipo de matriz, el tipo y la concentración de sal, el pH, aditivos y la temperatura.

El trabajo de los presentes inventores aquí descrito demuestra por vez primera el uso simultáneo de al menos dos presiones de selección, tales como DTT, HIC y temperatura aumentada, para mejorar las propiedades farmacológicas de proteínas terapéuticas usando tecnología de presentación, tal como presentación en ribosomas o en mRNA, en particular para mejorar la estabilidad relativa al tiempo de conservación.

Entre las ventajas de utilizar al menos dos presiones de selección, especialmente de forma simultánea, en comparación con las presiones de selección individuales o secuenciales es que la estrategia es más genérica y robusta. Según la experiencia de los inventores, ciertas proteínas no son susceptibles a una presión de selección sola, es decir, no son significativamente desestabilizadas por una presión sola, pero son susceptibles a dos presiones, especialmente cuando se aplican simultáneamente. Por ejemplo, los inventores han visto que el DTT solo puede ser insuficiente y solamente es útil para ciertos tipos de proteínas, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces disulfuro. De este modo, el presente invento en que se utiliza selección permite un método de selección más riguroso y la selección de cualquier proteína basándose en la estabilidad.

En los métodos del invento, se puede construir un banco de genes que codifiquen variantes polipeptídicas. Las variantes polipeptídicas pueden ser sometidas a una presión de selección en cuanto a estabilidad conforme se producen, por ejemplo, traduciéndolas en presencia de DTT. Una presión de selección en cuanto a estabilidad puede actuar durante la traducción de un polipéptido, durante la plegadura de un polipéptido naciente y/o después de la plegadura de un polipéptido.

Una presión de selección en cuanto a estabilidad que se puede utilizar mientras se produce un polipéptido, es decir, durante la traducción y la plegadura del polipéptido naciente, incluye DTT, glutatión, hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), mercaptoetanol, urea, guanidina HCl (GuHCl), disminución de chaperones, el pH, y pequeños inhibidores moleculares de la plegadura de proteínas. Los chaperones actúan para facilitar la plegadura de un polipéptido. Por lo tanto, su disminución afecta a la capacidad de un polipéptido para plegarse correctamente. Se puede disminuir la cantidad de chaperones de extractos exentos de células utilizando la inmunoprecipitación (IP). Se dispone comercialmente de anticuerpos contra todos los principales chaperones, tales como GroEL/GroES, DnaJ, DnaK, anticuerpos que podrían ser utilizados para la separación, basada en IP, de componentes específicos de un sistema de presentación en ribosomas. Se ha demostrado el mismo planteamiento para la separación de fosfatasa de extractos exentos de células, que mejoró la abundancia de ATP y, en consecuencia, el rendimiento relativo a la expresión [Shen et al. (1998), *Biochem. Eng. J.* 2: 23-28]. Además, se puede inhibir la plegadura mediante pequeñas moléculas específicamente diseñadas [Gestwicki et al. (2004), *Science* 306: 865-869]. Un pequeño inhibidor molecular de la plegadura de proteínas puede ser cualquier pequeña molécula que sea capaz de alterar o evitar la correcta plegadura de una proteína.

Se aplican simultáneamente dos presiones de selección en el proceso global de producción de las variantes (por ejemplo, durante la traducción) y en la selección (por ejemplo, por actividad ligante o biológica). Preferiblemente, se

aplican una o más presiones de selección durante la parte de selección del proceso, más preferiblemente dos presiones de selección en la parte de selección o más de dos. Puede haber una o más presiones de selección en la parte de traducción del proceso y una o más presiones de selección en la parte de selección del proceso.

5 La selección se realiza para variantes que son más estables y aún se unen a su ligando, receptor, o miembro específico de par ligante afines. Se incuban simultáneamente las variantes con dos o más presiones de selección en cuanto a estabilidad. En los métodos del invento, las presiones de selección en cuanto a estabilidad usadas incluyen HIC y temperatura ambiental. Las variantes activas mejoradas son capturadas por medio de su ligando, receptor o miembro específico de par ligante afines. Las presiones de selección pueden estar presentes durante la captura de  
10 variantes activas o pueden ser eliminadas antes de la incubación de las variantes con su ligando, receptor o miembro específico de par ligante afines.

Las presiones de selección en cuanto a estabilidad que se pueden utilizar incluyen DTT, glutatión, TCEP, mercaptoetanol, urea, GuHCl, tiocianato sódico, proteasas, HIC y temperatura aumentada.

15 En la HIC se puede utilizar una matriz para cromatografía por interacción hidrófoba o cualquier otra matriz hidrófoba adecuada, tal como, por ejemplo, una matriz que se utilice para cromatografía en fase inversa. Por ejemplo, una matriz adecuada para HIC es butyl-Sepharose™ (Amersham).

Por "temperatura aumentada" se quiere significar una temperatura que es mayor que la temperatura a la cual se lleva normalmente a cabo la técnica de presentación y que es al menos parcialmente desestabilizadora de proteínas.

20 Por ejemplo, como aquí se describe, la presentación en ribosomas se lleva normalmente a cabo a 4 °C para asegurar la estabilidad del complejo de ribosoma/mRNA/polipéptido. De este modo, una temperatura aumentada en un método en que se utiliza la presentación en ribosomas es una temperatura superior a 4 °C. Por ejemplo, una temperatura aumentada puede estar por encima de 15 °C o ser la temperatura ambiental o una temperatura superior a ella, por lo que se quiere significar cualquier temperatura de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C inclusive. Una temperatura aumentada puede ser o ser aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó  
25 30 °C. Preferiblemente, una temperatura aumentada es o es aproximadamente 25 °C. En los métodos del invento se utiliza HIC llevada a cabo a temperatura ambiental, preferiblemente a aproximadamente 25 °C.

Preferiblemente, una temperatura aumentada es al menos 20 °C mayor que la temperatura operativa habitual de un método de presentación, con objeto de que sirva como una presión de selección en cuanto a estabilidad.

30 Jermutus et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 75-80, describen el uso del agente reductor DTT como una presión de selección en la presentación en ribosomas para mejorar la estabilidad de las proteínas con puentes disulfuro.

Keefe y Szostak (2001), Nature 410: 715-718, y Matsuura y Pluckthun (2003), FEBS Letters 539: 24-38, describen el uso de HIC para la separación de péptidos no plegados y mal plegados de un banco de secuencias aleatorias antes de la selección.

35 Se ha descrito el uso de proteasas como una presión de selección [Matsuura y Pluckthun (2004), FEBS Letters 539: 24-38].

Por lo tanto, se han utilizado presiones de selección en la presentación en ribosomas, individual o secuencialmente. Sin embargo, en el presente invento se emplea por vez primera dos o más presiones de selección en cuanto a estabilidad en una tecnología de presentación que lleva incorporadas traducción *in vitro* y enlace no covalente entre el genotipo, tal como RNA, y el fenotipo codificado, tal como un polipéptido de interés.

40 El protocolo de selección difiere del habitual en la presentación en ribosomas.

Por ejemplo, en la presentación en ribosomas las selecciones se llevan a cabo a 4 °C para asegurar la estabilidad de los complejos de ribosoma/mRNA/proteína [Hanes et al. (2000), Meth. Enzymol. 328: 404]. Sin embargo, la HIC depende de la temperatura, y una temperatura mayor aumenta la interacción hidrófoba entre la matriz para HIC y la proteína. Con objeto de maximizar la presión de selección por HIC, la incubación con la matriz para HIC de acuerdo  
45 con realizaciones del presente invento se lleva a cabo a temperatura ambiental. De este modo, se pueden utilizar dos presiones de selección en combinación, HIC y temperatura aumentada, para seleccionar variantes polipeptídicas estables. Resultó inesperado hallar que los complejos ribosómicos eran estables a temperatura ambiental, lo que hacía posible dicho protocolo de selección.

50 El presente invento proporciona protocolos de selección en que se utilizan tres presiones de selección en cuanto a estabilidad: DTT, HIC y temperatura ambiental.

Las presiones de selección pueden actuar durante la plegadura del polipéptido naciente y/o sobre la proteína plegada.

Las presiones que actúan sobre la plegadura del polipéptido y no pueden ser eficaces sobre la molécula plegada

deberían añadirse durante la traducción y ser luego mantenidas durante el período posterior a la traducción. Éstas incluyen DTT, glutatión, TCEP, tiocianato sódico, mercaptoetanol, urea, GuHCl, pH, pequeños inhibidores moleculares de la plegadura, y chaperones disminuidos.

5 Las presiones que desestabilizan la proteína plegada podrían ser añadidas durante la traducción o ser limitadas a la operación postraduccional. Éstas incluyen urea, GuHCl, HIC, temperatura y proteasas.

Se ilustra una prueba de la utilidad y la eficacia del presente invento por referencia a la provisión de nuevas variantes de la eritropoyetina (EPO) humana, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; del inglés, granulocyte macrophage colony stimulating factor) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF; del inglés, granulocyte colony stimulating factor).

10 Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82: 7582-4, y K. Jacobs et al., Nature (1985) 313: 806-810, clonaron por vez primera la EPO humana y presentaron su secuencia de aminoácidos.

15 La EPO es un importante producto biofarmacéutico con unas ventas mundiales que superan los 3000 millones de dólares americanos. Se utiliza esencialmente para estimular la formación de eritrocitos y glóbulos rojos en pacientes para tratar la anemia asociada con una insuficiencia renal crónica, quimioterapia del cáncer, infección por VIH, uso pediátrico y niños prematuros, y para reducir la necesidad de transfusiones sanguíneas en pacientes anémicos que son sometidos a una cirugía no cardíaca y no vascular electiva.

20 La EPO humana es un glicoproteína ácida con un peso molecular de aproximadamente 30.400 dáltones. Está compuesta de una sola cadena polipeptídica invariable de 165 aminoácidos que contiene cuatro restos de cisteína (en las posiciones 7, 29, 33 y 161) que forman los enlaces disulfuro internos [Lai et al., J. Biol. Chem. 1986, 261: 3116-3121; Recny et al., J. Biol. Chem. 1987, 262: 17.156-17.163]. Se sabe que el puente disulfuro entre las cisteínas 7 y 161 es esencial para la actividad biológica. La porción carbohidratada de la EPO consiste en tres cadenas de azúcares N-enlazados en Asn 24, 38 y 83 y un azúcar O-enlazado en Ser 126 [J. K. Browne et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1986, 51: 693-702; J. C. Egrie et al., Immunobiology 1986, 172: 213-224].

25 Se ha presentado la estructura de la EPO humana [Cheetham et al., 1988, Nat. Struct. Biol. 5: 861-866; Syed et al., 1998, Nature 395: 511-516]. La EPO humana es un haz de cuatro hélices, típico de los miembros de la familia de factores de crecimiento hematopoyéticos. Por contraste con la secuencia de aminoácidos invariable, las estructuras carbohidratadas son variables, un rasgo al que se hace referencia como microheterogeneidad. Las diferencias en los componentes carbohidratados, en términos del patrón de ramificación, el tamaño de complejidad y la carga, ejercen efectos intensos sobre la farmacocinética y la farmacodinámica de la EPO. Los efectos de los diferentes patrones de glicosilación han sido bien estudiados [Darling et al., 2002, Biochemistry 41: 14.524-14.531; Storrington et al., 1998, Br. J. Haematol. 100: 79-89; Halstenson et al., 1991, Clin. Pharmacol. Ther. 50: 702-712; Takeuchi et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 12.127-12.130].

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es una citocina que regula la producción, función celular efectora y supervivencia de células mieloides.

35 El GM-CSF humano se usa en la reconstitución mieloide después de un trasplante de médula ósea, el fallo o retraso del arraigo de un trasplante de médula ósea, la movilización y después del trasplante de células progenitoras autólogas de sangre periférica, y después de la provocación de quimioterapia en adultos mayores con leucemia mielógena aguda. El GM-CSF está disponible bajo los nombres Leukine (Amgen) y Leucomax (Schering-Plough).

40 Cantrell et al., "Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (septiembre de 1985), 82 (18): 6250-4, clonaron por vez primera el GM-CSF humano y presentaron su secuencia de aminoácidos.

45 El GM-CSF es una proteína monómera de 127 aminoácidos con dos sitios de glicosilación. La proteína es sintetizada como un precursor de 144 aminoácidos que incluye una secuencia señal secretora hidrófoba en el extremo terminal amínico. El GM-CSF producido en células de mamífero se encuentra en diferentes formas de glicosilación cuyo tamaño varía de 14 a 35 kDa. No se requiere el componente de azúcar para el espectro completo de actividades biológicas. La estructura del GM-CSF es un haz de cuatro hélices [K. Diederichs, T. Boone y P. A. Karplus (1991); "Novel fold and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", Science 254: 1779-1782], similar al de otras citocinas de cuatro hélices. Codifica cuatro restos de cisteína que forman dos puentes disulfuro (posiciones 54/96 y 88/121).

50 El G-CSF humano se utiliza para disminuir la incidencia de infecciones relacionadas con una neutropenia febril (pérdida de neutrófilos) en pacientes que reciben fármacos mielosupresores para quimioterapia del cáncer asociados con una significativa incidencia de neutropenia grave con fiebre. El uso de un producto de G-CSF ayuda a los médicos a distribuir dosis planeadas para quimioterapia en el tiempo y mejorar los resultados clínicos. El G-CSF está disponible bajo los nombres comerciales Neupogen, Neulasta (G-CSF pegilado) y Granocyte.

55 Nagata et al., "The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocytes colony stimulating factor", Nature 5: 575-581 (1986), clonaron y expresaron por vez primera el G-CSF humano.

El G-CSF maduro es una proteína monómera de 174 aminoácidos con un sitio de O-glicosilación en Thr133 y dos puentes disulfuro intramoleculares (Cys36-Cys42 y Cys65-Cys74). La estructura del G-CSF es un haz de cuatro hélices (Hill et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5167-5171). La glicosilación contribuye a la estabilidad de la molécula pero no es necesaria para la actividad biológica (Oheda et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 11.432-11.435).  
 5 Se produce G-CSF recombinante en *Escherichia coli*, se recogen los cuerpos de inclusión y se vuelve a plegar el G-CSF (Documento US 5.849.883).

Hay diversos comunicados sobre variantes de G-CSF con una estabilidad mejorada, tales como, por ejemplo, Bishop et al., 2001, "Reengineering granulocyte colony-stimulating factor for enhanced stability", J. Biol. Chem. 276: 33.465-33.470; Lou et al., 2002, "Development of a cytokine analog with enhanced stability using computational ultrahigh throughput screening", Protein Science 11: 1218-1226; Fuji et al., 1997, "Structure of KW-228, a tailored human granulocyte colony stimulating factor with enhanced biological activity and stability", FEBS Letters 410: 131-135.  
 10

Sin embargo, en todos los artículos sobre producción de G-CSF en *E. coli* se usa la expresión citoplásmica, produciéndose cuerpos de inclusión a partir de los cuales se vuelve a plegar el G-CSF. No hay artículos sobre una exitosa expresión soluble de G-CSF humano en *E. coli* salvo en uno en que se usa un péptido señal de *Bacillus*, un hexámero de histidina y un sitio de escisión para factor Xa (Jeong y Lee, 2001, Protein Expression and Purification 23: 311-318). Esto dio lugar a una expresión soluble pero con una etiqueta de histidina N-terminal que no fue escindida, y no se demostró actividad biológica alguna.  
 15

Cuando se expresa en *E. coli*, una variante de G-CSF produce una proteína soluble, monómera y activa. Esto permite un procedimiento de expresión y purificación simplificado sin la necesidad de operaciones de nueva plegadura. Esto optimiza la preparación y puede resultar beneficioso en cuanto a propiedades de eficacia y almacenamiento.  
 20

El presente invento proporciona métodos aquí demostrados para proporcionar variantes de EPO, GM-CSF y G-CSF con una estabilidad mejorada, lo que se traduce en beneficios para el paciente y el fabricante. Las variantes con una estabilidad mejorada proporcionan generalmente una mayor expresión y un mayor rendimiento en el procesamiento aguas abajo, lo que da lugar a un coste de ventas (COG; del inglés, cost of goods) mejorado. Además, las variantes con estabilidad mejorada tienen un tiempo de conservación mejorado. Un tiempo de conservación más prolongado es beneficioso ya que también influye en el coste de ventas. Otro beneficio es una necesidad reducida de almacenamiento en frío, lo que facilita la distribución y ayuda a los pacientes que se autoadministran en casa.  
 25

Una variante con estabilidad mejorada puede tener una eficacia aumentada en el organismo como resultado de una semivida más prolongada. Además, una variante con estabilidad mejorada puede ajustarse mejor a las vías de administración, tal como la administración subcutánea, a causa de su agregación reducida, lo que no sólo aumenta la eficacia sino también reduce el riesgo de que se provoquen anticuerpos neutralizantes o ligantes.  
 30

El invento es igualmente aplicable a otros polipéptidos y a la selección de variantes polipeptídicas de estabilidad mejorada.  
 35

Como aquí se describe, el uso de múltiples presiones de selección, especialmente con aplicación simultánea, permite un protocolo de selección más genérico aplicable a la selección de cualquier polipéptido en lo relativo a la estabilidad. Se describen aquí características preferidas de un polipéptido para que sea el sujeto de este invento. Un polipéptido sujeto al invento debería poder ser presentado usando una tecnología de presentación que lleva incorporada traducción *in vitro* y enlace no covalente entre el genotipo, tal como RNA, y el fenotipo codificado, tal como un polipéptido de interés. Por lo tanto, es necesario que el polipéptido sea traducible en un sistema de expresión exento de células y que además se pueda plegar en dicho sistema hasta su estructura terciaria correcta.  
 40

Un polipéptido sujeto al invento puede ser monocistrónico o consistir en subunidades idénticas (homomultímero). Se puede emplear una molécula dímera fusionada en una cadena polipeptídica, expresada a partir de un único cistrón, tal como, por ejemplo, una molécula de anticuerpo Fv de cadena sencilla. Un polipéptido contiene preferiblemente restos de cisteína que pueden formar enlaces disulfuro, u otros restos que sean importantes para la plegadura y la estabilidad. Los elementos de un polipéptido que son importantes para la plegadura y la estabilidad pueden ser preferiblemente eliminados o afectados dependiendo de las condiciones, por ejemplo, mediante la adición de agentes reductores, o mediante mutagénesis dirigida al sitio.  
 45

Los ejemplos de proteínas sujetas al presente invento incluyen además, pero no se limitan a, miembros de la familia de proteínas con haces de cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas, tales como interferones e interleucinas, así como el dominio extracelular de receptores complejos, tal como el receptor II del factor de necrosis tumoral (TNFRII; del inglés, tumour necrosis factor receptor II).  
 50

En general, la estabilidad se puede definir como la tendencia de la molécula a permanecer en su estado plegado y activo. Las moléculas presentes en la naturaleza son normalmente de estabilidad limitada ya que su metabolismo, y a menudo su metabolismo rápido, es una característica esencial de su mecanismo intrínseco de acción en el organismo.  
 55

Normalmente, una proteína estable en su estructura plegada y nativa no puede ser degradada por proteasas u otros mecanismos. Se debe a dos vías esenciales del estado estable por las cuales se eliminan normalmente proteínas en el organismo. Éstas dos son el despliegue y la agregación. Están normalmente conectadas. El despliegue es la vía de revertir la molécula plegada activa hasta un estado menos plegado. La agregación es el resultado de una plegadura errónea tal que la molécula vuelve irreversiblemente a un estado no activo. Tanto el despliegue como la agregación aumentan significativamente la susceptibilidad de una proteína a una digestión proteolítica u otra digestión.

La agregación proteica es un inconveniente importante para la expresión de proteínas recombinantes en forma funcional soluble en *E. coli*. La agregación de proteínas recombinantes se debe probablemente a una cantidad limitante de chaperones. Bajo estas condiciones, la plegadura no es completa y los productos intermedios parcialmente plegados con superficies hidrófobas expuestas se salen de la ruta y se autoasocian. La autoasociación es la base de la agregación proteica y de la formación de cuerpos de inclusión [véase la revisión de Baneyx (1999), "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*", Curr. Opin. Biotechnol. 10: 411-421; Carrio y Villaverde (2002), J. Biotech. 96: 3-12; Georgiou y Valaw (1996), Curr. Opin. Biotechnol. 7: 190-197].

Se sabe que el GM-CSF expresado citoplásmicamente en *E. coli* forma agregados insolubles [Greenberg et al. (1988), Curr. Microbiol. 17: 321-332]. La expresión periplásmica también da lugar a la mayoría del producto en la fracción insoluble [Lundell et al. (1990), Biotechnology and Applied Biochemistry 12: 567-578].

La generación de variantes más estables de una proteína que es propensa a la agregación durante la expresión podría dar lugar a una proteína monómera soluble. Dicha proteína se puede plegar más eficazmente, es menos probable que se despliegue y, por lo tanto, tiene menos superficies hidrófobas expuestas que darían lugar a agregación. Esto aumentaría el rendimiento de la expresión en *E. coli* y eliminaría la necesidad de procesos de repliegue.

Se han realizado diversos intentos para mejorar la expresión soluble de proteínas. Por ejemplo, se han utilizado la modificación de las condiciones de cultivo, el uso de chaperones, la generación de proteínas de fusión y la ingeniería genética, y el uso de selecciones por GuHCl con grados variables de éxito.

En los métodos de acuerdo con realizaciones del presente invento, se altera la vía de plegadura y despliegue del polipéptido objetivo para que el elemento resultante sea más estable. Aunque se ha demostrado previamente la evolución de la estabilidad termodinámica aumentada de las proteínas [Jermutus et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 75-80], esta es la primera descripción de que la evolución *in vitro* y los resultantes cambios de aminoácido de este proceso pueden dar lugar a beneficios tangibles en bioterapéutica.

Se describen ahora realizaciones del invento con más detalle, sólo a modo de ejemplo y no de limitación, incluyendo la referencia a las figuras.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una transferencia Western de la producción de la variante F07 (Var. 1) y el tipo silvestre de GM-CSF. Se produjeron muestras del modo descrito en el texto. Carril 1: GM-CSF total F07 del lisado celular. Carril 2: Periprep de F07 con centrifugación a 4000 rpm. Carril 3: Periprep de F07 con centrifugación a 15.000 rpm. Carril 4: GM-CSF total de tipo silvestre del lisado celular. Carril 5: Periprep del tipo silvestre con centrifugación a 4000 rpm. Carril 6: Periprep del tipo silvestre con centrifugación a 15.000 rpm. Carril 7: marcador Magic (Invitrogen).

La Figura 2 muestra un gel, teñido con plata, de la producción del tipo silvestre (WT; del inglés, wild-type) y la variante (Var. 1) de G-CSF. La banda definida a aproximadamente 25 kDa en el carril para Var. 1 es G-CSF monómero. Las muestras se produjeron del modo descrito en los Ejemplos 6 y 7.

La Figura 3 muestra las pequeñas cantidades y rendimientos, por SEC, de 50 ml de expresión periplásmica para el tipo silvestre (WT) y la variante (Var. 1). Las muestras se produjeron del modo descrito en el Ejemplo 8. Para Var. 1, la flecha (1) indica G-CSF agregado y la flecha (2) indica G-CSF monómero. Para el G-CSF monómero [flecha (2)], el pico inferior se mide a una densidad óptica de 254 y el pico superior a una densidad óptica de 280.

De acuerdo con un aspecto del presente invento, se proporciona un método para proporcionar una variante del polipéptido objetivo con una estabilidad mejorada en comparación con la de un polipéptido objetivo parental de acuerdo con la Reivindicación 1.

En los métodos del invento se usa una tecnología de selección o presentación que lleva incorporada traducción *in vitro* y enlace no covalente entre el genotipo, tal como RNA, y el fenotipo codificado, tal como un polipéptido de interés, para seleccionar variantes polipeptídicas que tengan una estabilidad mejorada en comparación con el polipéptido parental y que conserven su funcionalidad.

En los métodos del invento se usa la tecnología de presentación en ribosomas. En el caso de la presentación en ribosomas, los complejos formados mediante un método del invento comprenden un ribosoma.

Se puede seleccionar una presión de selección en cuanto a estabilidad de entre ditioneitol (DTT), cromatografía por interacción hidrófoba (HIC) y temperatura ambiental (la aplicación de una temperatura aumentada proporciona una presión de selección en cuanto a estabilidad).

5 La presión de selección en cuanto a estabilidad durante la traducción de polipéptidos variantes es el ditioneitol (DTT). Opcionalmente, puede que no esté presente una presión de selección en cuanto a estabilidad durante la traducción.

Para seleccionar variantes polipeptídicas en métodos del invento, se usan simultáneamente al menos dos presiones de selección en cuanto a estabilidad.

10 Las presiones de selección usadas simultáneamente en la fase de selección son HIC y temperatura ambiental, preferiblemente en un proceso que comprende el uso de DTT en la fase de traducción. La temperatura aplicada como una presión de selección es la temperatura ambiental, preferiblemente cerca de 25 °C.

15 Durante la captura de variantes seleccionadas capaces de unirse a un receptor, ligando o miembro específico de par ligante que se une al polipéptido objetivo parental, pueden estar presentes una o más de las presiones de selección en cuanto a estabilidad. Alternativamente, se pueden eliminar una o más de las dos presiones de selección antes de la captura de variantes seleccionadas por el receptor, el ligando o el miembro específico de par ligante. La presencia o ausencia de una presión de selección puede depender, al menos en parte, de si una presión de selección puede interactuar con, o alterar la interacción entre, la variante seleccionada y el receptor, ligando o miembro específico de par ligante. Por ejemplo, cuando se utiliza una proteasa como una presión de selección, ésta es preferiblemente eliminada o inactivada antes de que se introduzca el receptor, ligando o miembro específico de par ligante, para evitar la degradación del receptor, el ligando o el miembro específico de par ligante por la proteasa.

20 En un método del invento, se puede determinar la estabilidad comparando las capacidades de la variante o variantes del polipéptido objetivo seleccionadas para unirse al receptor, ligando o miembro específico de par ligante en la presentación cuando se producen en presencia y ausencia de una presión de selección, por ejemplo, DTT.

25 Una medida de estabilidad empleada en el contexto del presente invento se puede expresar como una relación entre la capacidad de una variante para unirse al receptor, ligando o miembro específico de par ligante de la misma en presencia de ditioneitol (DTT), por ejemplo, DTT 10 mM, según se determina en un radioinmunoensayo (RIA), y la capacidad de la variante para unirse al receptor, ligando o miembro específico de par ligante en ausencia de DTT en el mismo radioinmunoensayo. Cuanto mayor sea el valor de la relación, mayor será la estabilidad de la variante y, en consecuencia, su existencia en estado plegado en un ambiente reductor.

30 En comparación con un polipéptido de tipo silvestre, una variante puede tener dicha relación mejorada en aproximadamente o al menos aproximadamente cinco órdenes de magnitud, más preferiblemente aproximadamente o al menos aproximadamente diez órdenes de magnitud, quince órdenes de magnitud, veinte órdenes de magnitud, veinticinco órdenes de magnitud o treinta órdenes de magnitud.

35 En un método del invento, se puede determinar la estabilidad comparando la agregación de la variante o variantes del polipéptido objetivo seleccionadas con la del polipéptido objetivo parental.

40 De este modo, otra medida de estabilidad que se puede emplear en el contexto del presente invento es comparar la agregación de un polipéptido variante con la del polipéptido de tipo silvestre a lo largo del tiempo. Por ejemplo, se pueden almacenar tanto el polipéptido de tipo silvestre como el variante en un intervalo de temperaturas (por ejemplo, de 5 °C a 45 °C) y se pueden analizar luego los productos de descomposición y el material agregado utilizando métodos rutinarios conocidos en la técnica. Una proteína estable permanece mejor en estado plegado y es menos susceptible de descomposición y agregación.

45 Se puede evaluar la agregación explorando la expresión de la proteína soluble, lo que comprende, por ejemplo, la expresión de una proteína seguida de centrifugación y análisis por PAGE e inmunotransferencia. La detección de bandas individuales que no desaparecen por centrifugación, a diferencia de una mancha o unas bandas que desaparecen tras una centrifugación, indica la presencia de una proteína soluble en vez de agregados.

Se puede evaluar la estabilidad de variantes polipeptídicas determinando la función o actividad de una variante en un ensayo de actividad biológica.

50 Un polipéptido variante con estabilidad mejorada puede conservar una actividad residual del 90% a una temperatura que es 2-10 °C mayor que aquélla a la cual la proteína de tipo silvestre conserva una actividad residual del 90%, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 °C mayor. El porcentaje de proteína residual (es decir, plegada y activa) se puede medir mediante técnicas bioquímicas rutinarias tales como HPLC y SDS-PAGE, o mediante ensayos de actividad tales como ensayos de unión, o provocando una respuesta de células.

55 Un método del invento puede comprender recuperar mRNA de un complejo seleccionado. De este modo, el mRNA de un complejo o complejos seleccionados puede ser aislado y/o usado para provisión de DNA, DNA que se puede utilizar en la producción del miembro específico codificado de par ligante y/o se puede emplear en otro ciclo de

selección usando presentación en ribosomas, presentación en mRNA u otros sistemas tales como presentación en bacteriófagos y presentación en levaduras.

Generalmente, se proporciona un banco, una población o un repertorio de diversas secuencias de mRNA que codifican un banco, una población o un repertorio de diversos péptidos o polipéptidos con el potencial para formar polipéptidos objetivo.

El sistema de traducción ribosómico empleado en un método del invento puede ser procariontario o eucariótico. Ambos están establecidos en la técnica para presentación y selección de diversas moléculas ligantes diferentes. Véanse, por ejemplo, Mattheakis et al. (1994), PNAS USA 91: 9022-9026; Mattheakis et al. (1996), Methods Enzymol. 267: 195-207; Gersuk et al. (1997), Biotech. and Biophys. Res. Com. 232: 578-582; Hanes y Plückthun, (1997), PNAS USA 94, 4937-4942; Hanes et al. (1998), PNAS USA 95: 14.130-50; He y Taussig (1997), NAR 5132-5234; Hanes et al. (2000), Meth. Enzymol. 328: 403-430; y Plückthun et al. (2000), Adv. Prot. Chem. 55: 367-403.

Una construcción para presentación en ribosomas puede comprender un promotor de RNA polimerasa (por ejemplo, el promotor de la polimerasa de T7), un sitio de unión de ribosomas, una secuencia de consenso de Kozak, un codón de iniciación y una secuencia de codificación de un polipéptido, péptido o proteína. Se pueden incluir una o más secuencias nucleotídicas que codifiquen una o más etiquetas de detección, para proporcionar la producción de un polipéptido, péptido o proteína que comprenda además una o más etiquetas de detección (por ejemplo, una etiqueta de histidina). Se pueden incorporar una o más características adicionales a una construcción para uso en una presentación en ribosomas, como se describe, por ejemplo, en el Documento WO 01/75097.

El sistema de traducción de mRNA usado en un método del invento puede ser cualquier sistema disponible adecuado. Se puede utilizar un sistema de traducción procariontario o eucariótico, tal como, por ejemplo, lisado crudo de *E. coli* o trigo (como el suministrado, por ejemplo, por Roche o Invitrogen), lisado de reticulocitos de conejo (como el suministrado, por ejemplo, por Ambion o Promega) o un sistema reconstituido tal como PURE [presentado por Shimizu et al., "Cell-free translation reconstituted with purified components", Nat. Biotechnol. 19 (2001), 751-755].

En ciertas realizaciones del presente invento, las moléculas de mRNA para incubación en el sistema de traducción se proporcionan por medio de reacciones RT-PCR en que al menos uno de los cebadores de RT-PCR es un cebador mutagénico que codifica una diversidad de secuencias diferentes para inclusión en una región definida de la región de codificación de mRNA. Por ejemplo, una región definida puede ser una que codifique una CDR de una molécula de anticuerpo, preferiblemente la CDR3 de un dominio VH de anticuerpo.

Una región definida para mutación puede comprender un resto considerado necesario para la estabilidad global de la proteína [Proba et al. (1998), J. Mol. Biol. 275: 245-253] o ser una zona de una proteína que es probable que esté implicada en procesos de agregación precoces, tales como bucles expuestos.

Como aquí se describe, los métodos del invento son aplicables a cualquier proteína que pueda ser producida en un sistema *in vitro*.

En realizaciones preferidas, los polipéptidos objetivo para presentación son moléculas de anticuerpo, normalmente moléculas de anticuerpo de cadena sencilla tales como moléculas de anticuerpo scFv, VH, Fd (que consiste en los dominios VH y CH1) o moléculas de dAb.

En otras realizaciones preferidas, se emplean polipéptidos objetivo que no son anticuerpos, y estos polipéptidos pueden incluir receptores, enzimas, péptidos, y ligandos de proteínas.

Los ejemplos de polipéptidos objetivo incluyen, pero no se limitan a, miembros de la familia de proteínas con haces de cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas, tales como interferones e interleucinas, así como el dominio extracelular de receptores complejos, tal como el receptor II del factor de necrosis tumoral (TNFRII).

En un método de acuerdo con el invento, mRNA recuperado de un complejo seleccionado que presenta una variante del polipéptido objetivo seleccionada puede ser multiplicado y copiado hasta un DNA que codifica la variante del polipéptido objetivo seleccionada.

Se puede proveer DNA en un sistema de expresión para la producción de un producto, producto que es la variante del polipéptido objetivo seleccionada o una cadena polipeptídica de la variante del polipéptido objetivo seleccionada. El DNA que codifica la variante del polipéptido objetivo seleccionada o una cadena polipeptídica de la variante del polipéptido objetivo seleccionada se puede proveer con una secuencia nucleotídica para proporcionar una secuencia nucleotídica que codifique una proteína de fusión que comprenda la variante del polipéptido objetivo seleccionada, o una cadena polipeptídica de la variante del polipéptido objetivo seleccionada, fusionada con aminoácidos adicionales. El DNA que comprende dicha secuencia nucleotídica que codifica dicha proteína de fusión se puede proveer en un sistema de expresión para la producción de un producto, producto que es la proteína de fusión. Los métodos del invento pueden comprender además aislar o purificar el producto.

Después de la selección y la recuperación del ácido nucleico que codifica la variante del polipéptido objetivo presentada, se puede utilizar el ácido nucleico para la provisión del polipéptido objetivo codificado o se puede utilizar

para la provisión de otro ácido nucleico (por ejemplo, por medio de una reacción de multiplicación tal como una PCR). Se puede someter el mRNA seleccionado a RT-PCR para generar copias de cDNA. El ácido nucleico que codifica partes componentes de una variante del polipéptido objetivo se puede utilizar para la provisión de otras moléculas, tales como, por ejemplo, moléculas de anticuerpo reformateadas, proteínas de fusión, inmunoadhesinas, etc. De este modo, por ejemplo, el ácido nucleico que codifica los dominios VH y VL de una molécula de anticuerpo scFv seleccionada se puede utilizar en la construcción de secuencias que codifiquen moléculas de anticuerpo de otros formatos, tales como moléculas de Fab o un anticuerpo completo.

Además, el ácido nucleico se puede someter a cualquier técnica disponible en este campo técnico para la alteración o mutación de su secuencia. Esto se puede utilizar para proporcionar una secuencia derivada. Se puede proveer una secuencia que codifique un derivado de la variante del polipéptido objetivo seleccionada o de un componente de la misma, tal como, por ejemplo, un derivado que comprenda una secuencia de aminoácidos que difiera de la de la variante del polipéptido objetivo seleccionada o de un componente de la misma, por adición, supresión, inserción y/o sustitución de una o más secuencias de aminoácidos. Un método que proporcione dicho derivado puede proporcionar una proteína de fusión o producto de conjugación en que un componente peptídico o polipeptídico adicional esté unido a la variante del polipéptido objetivo o a un componente de la misma, por ejemplo, una toxina o un marcador.

El ácido nucleico de codificación, esté reformateado o no, se puede utilizar en la producción del polipéptido o péptido codificado utilizando cualquier técnica disponible en este campo técnico para la provisión de polipéptidos y péptidos por expresión recombinante.

Aquí se describen otros aspectos y realizaciones del presente invento, y los aspectos y realizaciones preferidos están sujetos a las reivindicaciones incluidas más adelante.

El presente invento se ilustra mediante métodos en que el polipéptido objetivo parental es una eritropoyetina (EPO) de tipo silvestre. En particular, el polipéptido objetivo parental es EPO humana de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. nº 2.

Los métodos aquí descritos proporcionan una variante del polipéptido objetivo que comprende un conjunto de mutaciones en la secuencia humana de tipo silvestre de ID. SEC. nº 2, seleccionado del grupo que consiste en los conjuntos de mutaciones siguientes:

(1) L16I I25F T27M V61A R139H T157V

(2) D8V T26A T27A S126P G158E

(3) D8V T27A Y49N W64R V82A E89G 126P G158E

(4) T26A W64R A135V G158E

(5) D8V V74F T107A N147D.

Además, el presente invento se ilustra mediante métodos en que el polipéptido objetivo parental es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), de tipo silvestre. En particular, el polipéptido objetivo parental es GM-CSF humano de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. nº 4.

Los métodos aquí descritos proporcionan una variante del polipéptido objetivo que comprende el conjunto de mutaciones R4S L15H A18V I43V K63T T102A en la secuencia humana de tipo silvestre de ID. SEC. nº 4.

Además, el presente invento se ilustra mediante métodos en que el polipéptido objetivo parental es un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), de tipo silvestre. En particular, el polipéptido objetivo parental puede ser G-CSF humano de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. nº 6.

Los métodos aquí descritos proporcionan una variante del polipéptido objetivo que comprende el conjunto de mutaciones C17G W58R Q70R F83L en la secuencia humana de tipo silvestre de ID. SEC. nº 6.

En general, en aspectos y realizaciones del presente invento, el polipéptido parental comprende un dominio proteico plegado y, muy preferiblemente, presenta actividad biológica. La actividad biológica puede incluir la capacidad para unirse a una pareja ligante afín, tal como un receptor o un ligando, y puede incluir la capacidad para desencadenar una actividad receptora o una respuesta biológica, la capacidad para catalizar una reacción, etc.

Como aquí se describe, la medida de estabilidad empleada en el contexto del presente invento se puede expresar como una relación entre la capacidad de una variante del polipéptido objetivo para unirse a un receptor, ligando u otro miembro específico de par ligante afines después de la producción por traducción a partir de mRNA de codificación en presencia de ditiotreitol (DTT) o de cualquier otra presión de selección en cuanto a estabilidad, tal como, por ejemplo, una temperatura aumentada o la aplicación de una matriz para HIC, según se determina en un radioinmunoensayo (RIA), y la capacidad de la variante del polipéptido objetivo para unirse al receptor, ligando u otro

- 5 miembro específico de par ligante del polipéptido objetivo después de la producción por traducción a partir de mRNA de codificación en ausencia de toda presión de selección en el mismo radioinmunoensayo. La traducción se puede llevar a cabo en presencia de <sup>35</sup>S-Met para que se genere proteína radiactivamente marcada. Se puede determinar la unión inespecífica o unión de fondo aplicando la mezcla de traducción a un receptor no afin y/o un antígeno irrelevante tal como BSA, y midiendo la radiactividad residual sobre estas superficies.
- 10 Una medida de estabilidad de una variante del polipéptido objetivo seleccionada, por ejemplo una variante de EPO, empleada en el contexto del presente invento se puede expresar como una relación entre la capacidad de la variante, por ejemplo una variante de EPO, para unirse al receptor, ligando o miembro específico de par ligante de la misma, por ejemplo, un receptor de EPO para una variante de EPO, en presencia de ditiotreitól (DTT), por ejemplo, DTT 10 mM, según se determina en un radioinmunoensayo (RIA), y la capacidad de la variante, por ejemplo una variante de EPO, para unirse al receptor, ligando o miembro específico de par ligante, por ejemplo, un receptor de EPO para una variante de EPO, en ausencia de DTT en el mismo radioinmunoensayo. Cuanto mayor sea el valor de la relación, mayor será la estabilidad de la variante, por ejemplo, una variante de EPO, y, en consecuencia, su existencia en estado plegado en un ambiente reductor.
- 15 En comparación con la EPO de tipo silvestre, una variante de EPO puede tener dicha relación mejorada en aproximadamente o al menos aproximadamente cinco órdenes de magnitud, más preferiblemente aproximadamente o al menos aproximadamente diez órdenes de magnitud, quince órdenes de magnitud, veinte órdenes de magnitud, veinticinco órdenes de magnitud o treinta órdenes de magnitud.
- 20 La provisión de variantes con estabilidad mejorada y funcionalidad conservada se demuestra en los experimentos descritos más adelante. Véase, por ejemplo, la Tabla 1, que proporciona relaciones medidas de la unión al receptor de EPO en presencia y ausencia de DTT para la EPO de tipo silvestre (0,00) y diversas variantes de EPO (que varían de 0,1 a 0,33).
- 25 También como aquí se describe, una medida de estabilidad empleada en el contexto del presente invento puede ser la agregación. De este modo, se puede determinar la estabilidad comparando la agregación de una variante de EPO con la de la EPO de tipo silvestre a lo largo del tiempo. Por ejemplo, se pueden almacenar tanto la EPO de tipo silvestre como la EPO variante en un intervalo de temperaturas (por ejemplo, de 5 °C a 45 °C) y se pueden analizar luego los productos de descomposición y el material agregado utilizando métodos rutinarios conocidos en la técnica. Una proteína estable permanece mejor en estado plegado y es menos susceptible de descomposición y agregación.
- 30 Un polipéptido variante de EPO con estabilidad mejorada puede conservar una actividad residual del 90% a una temperatura que es 2-10 °C mayor que aquella a la cual la proteína de tipo silvestre conserva una actividad residual del 90%, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 °C mayor. El porcentaje de proteína residual (es decir, plegada y activa) se puede medir mediante técnicas bioquímicas rutinarias tales como HPLC y SDS-PAGE, o mediante ensayos de actividad tales como ensayos de unión, o provocando una respuesta de células.
- 35 Por ejemplo, se puede evaluar la agregación explorando la expresión de la proteína soluble, lo que comprende, por ejemplo, la expresión de una proteína seguida de análisis por PAGE e inmunotransferencia. La detección de bandas individuales en vez de una mancha por inmunotransferencia indica la presencia de proteína soluble en vez de agregados proteicos.
- 40 Mediante métodos del invento se identificaron variantes de GM-CSF que tenían perfiles de expresión mejorados. Los productos de variantes de GM-CSF se detectaron esencialmente como una sola banda en lugar de la mancha corrida del producto de tipo silvestre. Los productos de variantes de G-CSF también se detectaron como una sola banda.
- 45 La estabilidad de las variantes polipeptídicas se puede evaluar determinando la función o actividad de una variante en un ensayo de actividad biológica.
- Por ejemplo, se puede evaluar la estabilidad de variantes de GM-CSF en un ensayo de proliferación de células TF1 y se puede evaluar la estabilidad de variantes de G-CSF en un ensayo de proliferación de células OCI/AML5. Por supuesto, la naturaleza de un ensayo biológico utilizado para determinar la estabilidad depende de la función o actividad del polipéptido objetivo. En la técnica se conocen métodos adecuados para examinar actividades proteicas concretas.
- 50 La provisión de variantes con una estabilidad mejorada y una funcionalidad conservada se demuestra en los experimentos descritos más adelante. Véanse, por ejemplo, la Tabla 2, que proporciona resultados de los ensayos de proliferación de células TF1 para una variante de GM-CSF en comparación con el GM-CSF de tipo silvestre, y la Tabla 3, que proporciona resultados de los ensayos de proliferación de células OCI/AML5 para una variante de G-CSF en comparación con el G-CSF de tipo silvestre.
- 55 Se puede proveer una variante del polipéptido objetivo de acuerdo con el presente invento para que contenga uno o más cambios adicionales con respecto a un polipéptido de partida o parental, el cual puede ser una proteína natural o de tipo silvestre o una variante polipeptídica previamente obtenida. Se conocen diversas modificaciones diferentes para polipéptidos objetivo (tanto mutantes presentes en la naturaleza como variantes artificialmente creadas) con

propiedades modificadas en relación con el tipo silvestre. Una o más de estas propiedades se pueden conservar en, o proporcionar a, una variante del polipéptido objetivo de acuerdo con el presente invento.

Después de la provisión de acuerdo con un método del invento, la variante del polipéptido objetivo puede ser aislada y/o purificada (por ejemplo, utilizando un anticuerpo), por ejemplo, después de la producción por expresión a partir del ácido nucleico de codificación (para esto, véase más adelante). De este modo, se puede proveer un polipéptido exento o sustancialmente exento de contaminantes. Se puede proporcionar un polipéptido exento o sustancialmente exento de otros polipéptidos. El polipéptido aislado y/o purificado se puede utilizar en la formulación de una composición, que puede incluir al menos un componente adicional, tal como, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluya un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición que incluya un polipéptido de acuerdo con el invento puede ser utilizada en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico, como se discute más adelante.

Un modo conveniente de producir un polipéptido de acuerdo con el presente invento es hacer que se exprese el ácido nucleico que lo codifica, mediante el uso del ácido nucleico en un sistema de expresión. En consecuencia, el presente invento también abarca un método para preparar un polipéptido (como el descrito), método que incluye la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido (generalmente un ácido nucleico de acuerdo con el invento). Esto puede ser llevado convenientemente a cabo desarrollando una célula huésped, que contiene dicho vector, en cultivo bajo las condiciones apropiadas que causan o permiten la expresión del polipéptido. También se pueden expresar polipéptidos en sistemas *in vitro*, tal como un lisado de reticulocitos.

Los sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células eucarióticas tales como células de mamífero y levaduras, y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células renales de cría de hámster, células COS y muchas otras. Un huésped bacteriano preferido común es *E. coli*. Se pueden escoger o construir vectores adecuados que contengan apropiadas secuencias reguladoras, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virus, por ejemplo, fagos, o fagómidos, según sea apropiado. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. En "Current Protocols in Molecular Biology", redactado por Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992, se describen con detalle muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de DNA en células y expresión génica, y análisis de proteínas.

De acuerdo con métodos del invento se puede proveer un ácido nucleico que codifique una variante del polipéptido objetivo. Generalmente, el ácido nucleico de acuerdo con el presente invento se provee como un producto de aislamiento, en forma aislada y/o purificada, o exento o sustancialmente exento de contaminantes. El ácido nucleico puede ser total o parcialmente sintético y puede incluir DNA genómico, cDNA o RNA.

El ácido nucleico se puede proporcionar como parte de un vector replicable, y el presente invento también proporciona un vector que incluye un ácido nucleico que codifica una variante del polipéptido objetivo del invento, particularmente cualquier vector de expresión a partir del cual se puede expresar el polipéptido codificado bajo unas condiciones apropiadas, y una célula huésped que contiene dicho vector o dicho ácido nucleico. En este contexto, un vector de expresión es una molécula de ácido nucleico que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés y unas apropiadas secuencias reguladoras para la expresión del polipéptido, en un sistema de expresión *in vitro*, por ejemplo, un lisado de reticulocitos, o *in vivo*, por ejemplo, en células eucarióticas tales como células COS o CHO, o en células procarióticas tales como *E. coli*.

Se puede proveer una célula huésped que contenga un ácido nucleico como el aquí descrito. El ácido nucleico se puede integrar en el genoma (por ejemplo, un cromosoma) de la célula huésped. Se puede promover la integración mediante la inclusión de secuencias que promuevan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándares. El ácido nucleico puede estar en un vector extracromosómico dentro de la célula.

El ácido nucleico se puede introducir en una célula huésped. Para la introducción, a la que se hace generalmente referencia sin limitación como "transformación" o "transfección" (particularmente para la introducción *in vitro*), se puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucarióticas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando un retrovirus u otro virus, tal como, por ejemplo, un virus vaccinia o, para células de insecto, un baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro cálcico, electroporación y transfección usando un bacteriófago.

Se pueden utilizar genes marcadores, tales como genes de resistencia o sensibilidad a antibióticos, para identificar clones que contengan el ácido nucleico de interés, como es bien sabido en la técnica.

La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión del ácido nucleico mediante, por ejemplo, el

cultivo de células huésped (que pueden incluir células realmente transformadas, aunque más probablemente las células serán descendientes de las células transformadas) bajo condiciones para la expresión del gen, para que se produzca el polipéptido codificado. Si el polipéptido se expresa conectado a un péptido líder señal apropiado, puede ser secretado por la célula al medio de cultivo. Después de la producción por expresión, se puede aislar y/o purificar un polipéptido de la célula huésped y/o el medio de cultivo, según sea el caso, y se puede usar posteriormente del modo deseado, por ejemplo, en la formulación de una composición que puede incluir uno o más componentes adicionales, tal como una composición farmacéutica que incluye uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, véase más adelante).

Después de la producción de una variante del polipéptido objetivo por expresión, se puede examinar rutinariamente su actividad, por ejemplo, su capacidad para unirse a un receptor, ligando u otro miembro específico de par ligante del polipéptido objetivo.

También se describe aquí un método para preparar una variante del polipéptido objetivo con una estabilidad mejorada en comparación con la de un polipéptido objetivo parental, método que comprende:

producir una variante del polipéptido objetivo por expresión a partir del ácido nucleico de codificación, en que la producción es por traducción en presencia y ausencia de DTT, y la producción es en un sistema de presentación en ribosomas tal que se producen complejos ribosómicos cada uno de los cuales comprende una variante del polipéptido objetivo y mRNA que codifica la variante del polipéptido objetivo; y

examinar la variante del polipéptido objetivo comprendida en los complejos ribosómicos en cuanto a una estabilidad mejorada en comparación con la del polipéptido objetivo parental usando como medida de estabilidad, por ejemplo, la relación entre la actividad de unión a un receptor, ligando o miembro específico de par ligante del polipéptido objetivo cuando se traduce en presencia de DTT en un radio inmunoensayo, y la actividad de unión a un receptor, ligando o miembro específico de par ligante del polipéptido objetivo cuando se traduce en ausencia de DTT en el mismo ensayo, en que la capacidad de unión se evalúa en presencia de cromatografía por interacción hidrófoba que se lleva a cabo a temperatura ambiental.

La relación puede resultar mejorada en aproximadamente o al menos aproximadamente cinco órdenes de magnitud o más, como aquí se indica en otra parte.

Se describe además un método para preparar un polipéptido variante del polipéptido objetivo que tiene una estabilidad mejorada en comparación con la del polipéptido objetivo parental, método que comprende:

producir una variante del polipéptido objetivo en un sistema de presentación en ribosomas por expresión del ácido nucleico de codificación en presencia y ausencia de DTT; y

examinar la estabilidad mejorada por comparación de la unión de la variante del polipéptido objetivo a un receptor, ligando o miembro específico de par ligante afines cuando se presenta en ribosomas y se produce en presencia y ausencia de DTT, usando cromatografía por interacción hidrófoba a temperatura ambiental.

Un método del invento puede comprender la operación de aislar la variante del polipéptido objetivo antes del ensayo y/o mutar el ácido nucleico que codifica un polipéptido objetivo parental, para proporcionar un ácido nucleico que codifica una variante del polipéptido objetivo antes de su expresión a partir de aquél.

Dicho método puede incluir opcionalmente el aislamiento y/o purificación de la variante del polipéptido objetivo después de su producción y antes de su ensayo.

Alguien que lleve el método a cabo puede llevar además a cabo la operación previa de proveer una variante del polipéptido objetivo alterando la secuencia de aminoácidos de la variante del polipéptido objetivo mediante, por ejemplo, sustitución y/o inserción de uno o más aminoácidos, como se discute. Se pueden proveer diversas variantes diferentes y se pueden examinar en cuanto a la actividad deseada, por ejemplo, con objeto de identificar, de una diversidad de variantes, una o más variantes con las propiedades deseadas de acuerdo con el presente invento. Normalmente, se realizará la alteración de la secuencia de aminoácidos del polipéptido objetivo alterando la secuencia de codificación del ácido nucleico que codifica el polipéptido objetivo. Se pueden alterar uno o más nucleótidos para alterar uno o más codones y, por lo tanto, el(los) aminoácido(s) codificado(s). Como aquí se menciona en otra parte y resultará evidente a los expertos en la técnica, se puede emplear cualquier técnica adecuada para mutagénesis, especialmente la mutagénesis dirigida o específica del sitio, con objeto de cambiar la secuencia de codificación, y por lo tanto la secuencia de aminoácidos codificada, para una variante del polipéptido objetivo [revisado por McPherson y Moller (2000), "PCR: The Basics from Background to Bench"; BIOS Scientific Publishers Ltd.].

En la selección de una variante del polipéptido objetivo con estabilidad mejorada de acuerdo con el presente invento se pueden emplear presentación en ribosomas, traducción en el sistema de presentación en ribosomas en presencia y ausencia de DTT, y selección de variantes del polipéptido objetivo en el complejo con ribosomas y mRNA usando HIC a temperatura ambiental.

También se describe aquí un método para proveer, identificar u obtener una variante del polipéptido objetivo que tenga una estabilidad mejorada en comparación con la del polipéptido objetivo parental, método que comprende:

5 mutar el ácido nucleico que codifica un polipéptido objetivo parental para proporcionar uno o más ácidos nucleicos con secuencias que codifiquen una o más variantes del polipéptido objetivo con secuencias de aminoácidos alteradas ("variantes del polipéptido objetivo");

hacer que se exprese el ácido nucleico o los ácidos nucleicos como mRNA en un sistema de presentación en ribosomas para producir, por traducción del mRNA, la variante o variantes del polipéptido objetivo codificadas, en que la traducción se lleva a cabo en presencia de DTT y en ausencia de DTT; y

10 seleccionar una variante o variantes del polipéptido objetivo así producidas en cuanto a una estabilidad mejorada en comparación con la del polipéptido objetivo parental mediante cromatografía por interacción hidrófoba, en que la cromatografía por interacción hidrófoba se lleva a cabo a temperatura ambiental.

Por temperatura ambiental se quiere significar cualquier temperatura de entre 20 °C o más y 30 °C o menos, preferiblemente de aproximadamente 25 °C.

15 Se puede producir un banco o una población diversa de variantes y se puede examinar en cuanto a las capacidades deseadas.

La mutación puede ser en cualquier resto identificado dentro de un conjunto de mutaciones como las aquí descritas, cualquier cisteína y/o cualquier resto en que se produzca N-glicosilación, o de cualquier otra forma que aquí se describa.

20 El polipéptido objetivo que se somete a la mutación puede ser un polipéptido de tipo silvestre o una variante existente, tal como, por ejemplo, una variante previamente seleccionada basándose en una propiedad deseada, por ejemplo, una estabilidad mejorada o aumentada.

Se pueden identificar o seleccionar una o más variantes del polipéptido objetivo con las propiedades deseadas.

25 Una vez que se ha identificado u obtenido una variante del polipéptido objetivo, se puede proporcionar en forma aislada y/o purificada, se puede utilizar según se desee y se puede formular en una composición que comprenda al menos un componente adicional, tal como un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El ácido nucleico que codifica la variante del polipéptido objetivo puede ser utilizado para producir la variante para un uso posterior. Como se indicó, dicho ácido nucleico puede ser, por ejemplo, aislado de un banco o una población diversa inicialmente proporcionados y a partir de los cuales se produjo e identificó la variante del polipéptido objetivo.

30 Se puede usar una variante del polipéptido objetivo en métodos de diagnóstico o tratamiento del cuerpo humano o animal de sujetos, preferiblemente seres humanos.

35 Los métodos de tratamiento pueden comprender la administración de una variante del polipéptido objetivo como la proporcionada, composiciones farmacéuticas que comprenden dicha variante del polipéptido objetivo, y el uso de dicha variante del polipéptido objetivo en la fabricación de un medicamento para administración, por ejemplo, en un método para preparar un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular la variante del polipéptido objetivo con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las circunstancias clínicas en que se puede utilizar una variante del polipéptido objetivo son aquellas en que el polipéptido objetivo proporciona un beneficio terapéutico.

40 Se puede administrar una variante del polipéptido objetivo a un individuo, preferiblemente mediante administración en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede ser considerada terapia), siendo ésta suficiente para que el individuo muestre un beneficio. La cantidad real administrada, y el ritmo y el curso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se trata. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., es responsabilidad de los internistas y otros médicos.

45 Una composición puede ser administrada sola o en combinación con otros tratamientos, sea simultánea o sea secuencialmente, dependiendo del estado que se trata.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón o estabilizante farmacéuticamente aceptables, u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales deberían ser atóxicos y no deberían interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser cualquier vía adecuada pero es muy probablemente la inyección, especialmente la inyección intravenosa.

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o inyección en el sitio de la aflicción, el ingrediente activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que estará exenta de pirógenos y tendrá un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Quienes tienen una experiencia relevante en la técnica podrán preparar

disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como cloruro sódico para inyección, Ringer para inyección o Ringer-lactato para inyección. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, según se requieran.

5 Otros aspectos y realizaciones del presente invento resultarán evidentes a los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, incluyendo la ejemplificación experimental siguiente.

### **EJEMPLOS EXPERIMENTALES**

#### Ejemplo 1

#### Construcción de un banco de variantes de EPO y selección de variantes de EPO en cuanto a una estabilidad mejorada

##### 10 Construcción del banco

Se obtuvo cDNA de EPO de Invitrogen. Se reformateó la secuencia madura en el molde lineal para presentación en ribosomas, que fue posteriormente utilizado para la creación del banco. A nivel de DNA, se añadió un promotor de T7 en el extremo 5' para una transcripción eficaz a mRNA. A nivel de mRNA, la construcción contenía un sitio procarrióico de unión de ribosomas (secuencia Shine-Dalgarno). En el extremo 3', se añadió una porción de gIII para que actuara como un espaciador [Hanes et al. (2000), Meth. Enzymol. 328: 404]. Se creó un banco de variantes utilizando una PCR propensa a errores, siguiendo el protocolo del fabricante (BD Bioscience), con un índice de errores de 8,1 mutaciones nucleotídicas/molécula. Esto introdujo 4 mutaciones por molécula y un banco de aproximadamente  $2,5 \times 10^{10}$  moléculas variantes.

#### Selecciones en cuanto a estabilidad

20 Las selecciones se llevaron a cabo con al menos dos presiones de selección simultáneas en cuanto a estabilidad que incluían: DTT, HIC y temperatura aumentada, seguidas de selección en cuanto a actividad funcional.

25 El agente reductor ditioneitol (DTT) estuvo presente durante la traducción y la selección. El DTT evita la formación de puentes disulfuro, que son componentes importantes de la estabilidad de la EPO. Después de la traducción, la mezcla de traducción con DTT fue incubada a 25 °C con una matriz para cromatografía por interacción hidrófoba (HIC). La combinación de DTT, HIC y una temperatura aumentada de 25 °C en comparación con la habitual de 4 °C debería permitir la captura y separación de las variantes menos estables que no se han plegado y/o se han plegado mal a causa de la presión de selección. La matriz para HIC se separa de la mezcla mediante, por ejemplo, centrifugación o filtración. Puede que también sea necesaria una operación de intercambio de tampón antes de avanzar a la selección funcional.

30 Las traducciones y selecciones *in vitro* se llevaron a cabo en presencia y ausencia de DTT del modo descrito en Jermutus et al. (2001), con las excepciones siguientes:

1. Las traducciones se llevaron a cabo a 30 °C durante 10 minutos.

35 2. Se utilizaron HIC y temperatura aumentada como presiones de selección añadidas. Después de la traducción con y sin DTT, se detuvo la traducción en un tampón que contenía KCl (1 M que aumentaba a 3 M) y DTT con la misma concentración que en la traducción. La mezcla de traducción fue luego incubada con un volumen de lecho de 1 ml de glóbulos para HIC (butyl-, octyl- y phenyl-Sepharose, Amersham). Después de un sacudimiento durante 30 minutos a 25 °C, los glóbulos para HIC fueron separados por centrifugación a temperatura ambiental.

40 3. Luego se enfrió el sobrenadante a 4 °C y se llevaron a cabo selecciones funcionales mediante las cuales, después de la incubación del banco seleccionado en cuanto a estabilidad con la proteína de fusión del receptor de EPO, se capturó la proteína de fusión y se recuperaron los complejos unidos mediante separación magnética mientras los complejos no unidos eran eliminados por lavado. Luego se recuperó por RT-PCR el mRNA que codificaba las variantes de EPO unidas y se repitió el proceso de selección. Se llevaron a cabo cuatro ciclos de selección con combinaciones más desestabilizantes de DTT, HIC y temperatura aumentada.

45 Los productos de PCR del ciclo 4 fueron clonados en el vector de expresión *in vitro* pIVEX2.3d (Roche). En resumen, las producciones fueron multiplicadas por PCR para introducir un sitio de restricción 5' para NcoI en el extremo 3' y un codón de parada inmediatamente seguido de un sitio de restricción para NotI. El codón de parada permitía la expresión de la EPO variante no etiquetada. El producto fue purificado en gel, doblemente digerido con NotI y NcoI (New England Biolabs) y purificado en gel. Se ligó el producto digerido a pIVEX2.3d digerido con NotI y NcoI y se transformaron células de *E. coli* TG1 con él. Las colonias individuales fueron clasificadas en placas de 96 pocillos para exploración y secuenciación.

#### Ejemplo 2

#### Exploración de variantes individuales de EPO mediante RIA para estabilidad primaria

5 Las variantes de EPO fueron exploradas en cuanto a estabilidad utilizando el radioinmunoensayo (RIA) para estabilidad primaria del modo descrito por Jermutus et al. (2001). En resumen, para cada variante, un molde de DNA lineal fue multiplicado y transcrito, y el mRNA fue purificado en columnas de Sephadex G25 y fue cuantificado. Para cada variante, se pusieron a punto por duplicado traducciones *in vitro* en presencia de metionina marcada con <sup>35</sup>S, a 30 °C durante 30 minutos, una en condiciones no reductoras y una en ditioneitol (DTT) 10 mM. Las traducciones se detuvieron con PBS con Tween 20 al 0,05%, con DTT en la misma concentración que en las traducciones. La mezcla de traducción fue incubada en una placa revestida con receptor de EPO, durante 1 hora a temperatura ambiental. Las placas fueron lavadas tres veces en PBS con Tween 20 al 0,05% y tres veces en PBS.

10 La radiactividad restante fue eluida con trietilamina 0,1 M y fue cuantificada mediante recuento de centelleo en estado líquido. Se calculó una medida de la estabilidad de las variantes dividiendo la señal del RIA en DTT 10 mM por la señal del RIA en ausencia de DTT. Cuanto más estable es la variante, mayor es la relación; es decir, si es inactiva en DTT, la relación = 0, y si es totalmente activa en DTT, la relación = 1.

Se exploraron cuarenta y ocho variantes clonadas de EPO del ciclo 4 del modo anteriormente descrito. De entre éstas, se identificaron 5 variantes de EPO que eran más estables que el WT (Tabla 1).

Clon	DTT-	DTT+/DTT-
EPO WT	5009	0,00
Var. 1	67.552	0,33
Var. 2	4890	0,14
Var. 3	13.553	0,12
Var. 4	40.087	0,1
Var. 5	14.895	0,1

15 Tabla 1. Resultados del RIA de estabilidad para 5 variantes, con la señal absoluta del RIA después de condiciones no reductoras (DTT-) y una medida de estabilidad calculada del modo descrito en el texto (DTT+/DTT-).

#### Análisis de secuencias de variantes de EPO

20 Se secuenciaron las variantes de EPO del ciclo 4. Se describen a continuación las secuencias de las 5 variantes más estables como diferencias a nivel de aminoácido con respecto a la EPO WT que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como ID. SEC. n° 2.

Var. 1 L16I I25F T27M V61A R139H T157V  
 Var. 2 D8V T26A T27A S126P G158E  
 Var. 3 D8V T27A Y49N W64R V82A E89G S126P G158E  
 Var. 4 T26A W64R A135V G158E  
 Var. 5 D8V V74F T107A N147D

#### Ejemplo 3

##### Construcción de un banco de variantes de GM-CSF y selección en cuanto a estabilidad para mejorar la expresión

##### Construcción del banco

25 Se clonó cDNA de GM-CSF humano y se reformateó la secuencia madura en el molde lineal para presentación en ribosomas, que fue posteriormente utilizado para la creación del banco. A nivel de DNA, se añadió un promotor de T7 en el extremo 5' para una transcripción eficaz a mRNA. A nivel de mRNA, la construcción contenía un sitio procariótico de unión de ribosomas (secuencia Shine-Dalgarno). En el extremo 3', se añadió una porción de gIII para que actuara como un espaciador [Hanes et al. (2000), Meth. Enzymol. 328: 404]. Se creó un banco de variantes utilizando una PCR propensa a errores, siguiendo el protocolo del fabricante (BD Bioscience), con un índice de errores de 8,1 mutaciones nucleotídicas/molécula. Esto introdujo 3 mutaciones por molécula.

##### Selecciones en cuanto a estabilidad

Las selecciones se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 con al menos dos presiones de selección simultáneas en cuanto a estabilidad que incluían: DTT, HIC y temperatura aumentada, seguidas de selección en cuanto a actividad

funcional por unión a la proteína de fusión del receptor de GM-CSF. Se llevaron a cabo cuatro ciclos de selección con combinaciones crecientemente desestabilizantes de DTT, HIC y temperatura aumentada.

El producto de PCR del ciclo 4 fue clonado en el vector de expresión periplásmica pCANTAB6 [McCafferty et al., Appl. Biochem. Biotechnol. (mayo-junio de 1994), 47 (2-3): 157-71; discusión: 171-3]. En resumen, las producciones fueron multiplicadas por PCR para introducir un sitio de restricción 5' para NcoI en el extremo 3' y un sitio de restricción para NotI. El producto fue purificado en gel, doblemente digerido con NotI y NcoI (New England Biolabs) y purificado en gel. Se ligó el producto digerido a pCANTAB6 digerido con NotI y NcoI y se transformó *E. coli* HB2151 (Biostat Diagnostics) con él. Las colonias individuales fueron clasificadas en placas de 96 pocillos para exploración y secuenciación.

#### 10 Ejemplo 4

##### Exploración de variantes individuales de GM-CSF en una exploración de expresión primaria

Se exploraron variantes de GM-CSF en cuanto a expresión soluble utilizando expresión en 96 pocillos, PAGE e inmunotransferencia. En resumen, se llevó a cabo la expresión soluble utilizando el Sistema de Autoinducción Overnight Express™ (Merck Bioscience) y se desarrolló el producto en el sistema de electroforesis E-PAGE para proteínas (Invitrogen). Para la extracción periplásmica, se recolectaron las células por centrifugación. Se liberó el material periplásmico por choque osmótico y se eliminaron los fragmentos celulares por centrifugación, quedando la proteína expresada en los sobrenadantes. Se desarrollaron muestras de las proteínas extraídas utilizando el sistema E-PAGE (Invitrogen) de SDS-PAGE, que permitía que se desarrollaran simultáneamente 96 muestras. Luego se transfirió el gel a una membrana de PVDF y se sondó posteriormente con un anticuerpo policlonal anti-GM-CSF humano (Chemicon), realizándose la detección con un producto de conjugación de HRP y anti-IgG de conejo (Dako UK), el reactivo quimioluminiscente ECL Plus (Amersham) y captura de imágenes usando el dispositivo Lumi Imager (Boehringer Mannheim).

Se exploraron ochenta y ocho variantes de GM-CSF del ciclo 4 del modo anteriormente descrito. De entre éstas, se identificaron variantes de GM-CSF que tenían perfiles de expresión mejorados. Los productos de estas variantes eran esencialmente una única banda detectada con anticuerpo anti-GM-CSF, en lugar de la mancha corrida del producto de tipo silvestre.

#### 25 Ejemplo 5

##### Expresión soluble de una variante de GM-CSF

Se compararon por duplicado las producciones periplásmicas de una variante de GM-CSF y el tipo silvestre. Se llevó a cabo la expresión de proteína recombinante de pCANTAB6 en *E. coli* HB2151 (Biostat Diagnostics) utilizando el Sistema de Autoinducción Overnight Express™ (Merck Bioscience) en un volumen de 50 ml en un matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad. La densidad final del cultivo se midió mediante la absorbancia de una dilución 1 en 10 del cultivo a una longitud de onda de 600 nm (DO<sub>600</sub>). Todos los cultivos fueron normalizados a una DO<sub>600</sub> de 1,0. Se recolectaron las células por centrifugación, se liberó el material periplásmico por choque osmótico [utilizando Tris 200 mM (pH de 8,0 a 4 °C), EDTA 1 mM y sacarosa 0,5 M] y se eliminaron los fragmentos celulares por centrifugación de baja velocidad a 4000 rpm utilizando una microcentrífuga. La proteína insoluble se separó del extracto periplásmico mediante una centrifugación de alta velocidad a 15.000 rpm en una microcentrífuga. Las muestras se desarrollaron en el sistema de gel NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen) en tampón de MES 1x. Se transfirió el gel a una membrana de PVDF y se sondó posteriormente con un anticuerpo policlonal anti-GM-CSF humano (Chemicon), realizándose la detección con un producto de conjugación de HRP y anti-IgG de conejo (Dako UK), el reactivo quimioluminiscente ECL Plus (Amersham) y captura de imágenes usando el dispositivo Lumi Imager (Boehringer Mannheim).

La variante de GM-CSF Var.1 (F07) producía proteína soluble en el periplasma, como se muestra en la Figura 1. El GM-CSF de tipo silvestre no produjo proteína soluble (Figura 1), como se esperaba (Lundell et al., 1990).

Se evaluó la actividad biológica de la variante y del tipo silvestre en un ensayo de proliferación de células TF-1. Las células TF-1 se obtuvieron de R&D Systems y se mantuvieron de acuerdo con los protocolos proporcionados. Los medios de ensayo comprendían RPMI-1640 con GLUTAMAX I que contenía suero bovino fetal al 5% y piruvato sódico al 1%. Antes de cada ensayo se recogieron las células TF-1 como sedimento de una centrifugación a 300 x g durante 5 minutos, se eliminaron los medios por aspiración y se resuspendieron las células en medios de ensayo. Se repitió este proceso tres veces más, con las células resuspendidas en una concentración final de 1x10<sup>5</sup>/ml en medios de ensayo. Se diluyeron las variantes de GM-CSF (por duplicado) en medios de ensayo hasta las concentraciones deseadas. Luego se añadieron 100 µl de células resuspendidas a cada punto de ensayo para obtener un volumen de ensayo total de 200 µl/pocillo. Se incubaron las placas de ensayo a 37 °C durante 72 horas bajo CO<sub>2</sub> al 5%. Luego se añadieron 20 µl de timidina tritiada (1,85 x 10<sup>5</sup> Bq/ml, NEN) a cada punto de ensayo y se volvió a poner las placas de ensayo en la incubadora durante otras 4 horas. Se recolectaron las células en placas con filtros de fibra de vidrio (Perkin Elmer) usando un recolector de células. Se determinó la incorporación de timidina usando un contador Packard TopCount de centelleo en estado líquido para microplacas. Se analizaron los

datos utilizando el software Graphpad Prism.

El GM-CSF Var. 1 era más activo que el GM-CSF de tipo silvestre en el ensayo de proliferación de células TF-1 (Tabla 2):

Tabla 2. EC<sub>50</sub> del GM-CSF de tipo silvestre (WT) y la variante Var. 1

5

en el ensayo de proliferación de células TF-1

Muestra	EC <sub>50</sub> (nM)
WT	1,179
Var. 1	0,032

#### Análisis de la secuencia de la variante de GM-CSF

Se secuenció la variante Var.1. Se describe a continuación la secuencia de la variante como diferencias a nivel de aminoácido con respecto al GM-CSF WT que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. nº 4.

Var. 1 R4S L15H A18V I43V K63T T102A

#### Ejemplo 6

#### 10 Construcción de un banco de variantes de G-CSF y selección en cuanto a estabilidad para mejorar la expresión

##### Construcción del banco

15 Se clonó cDNA de G-CSF humano y se reformatearon las secuencias maduras en el molde lineal para presentación en ribosomas, que fue posteriormente utilizado para la creación del banco. A nivel de DNA, se añadió un promotor de T7 en el extremo 5' para una transcripción eficaz a mRNA. A nivel de mRNA, la construcción contenía un sitio procarrióico de unión de ribosomas (secuencia Shine-Dalgarno). En el extremo 3', se añadió una porción de gIII para que actuara como un espaciador [Hanes et al. (2000), Meth. Enzymol. 328: 404]. Se creó un banco de variantes utilizando una PCR propensa a errores, siguiendo el protocolo del fabricante (BD Bioscience), con un índice de errores de 8,1 mutaciones nucleotídicas/molécula. Esto introdujo 3 mutaciones por molécula.

##### Selecciones en cuanto a estabilidad

20 Las selecciones se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 con al menos dos presiones de selección simultáneas en cuanto a estabilidad que incluían DTT, temperatura y HIC, seguidas de selección en cuanto a actividad funcional por unión al receptor biotinilado de G-CSF (RnD, nº 381-ER-05 del catálogo). Se llevaron a cabo cuatro ciclos de selección con combinaciones crecientemente desestabilizantes de DTT, HIC y temperatura.

25 El producto de PCR del ciclo 4 fue clonado en el vector de expresión periplásmica pCANTAB6 [McCafferty et al., Appl. Biochem. Biotechnol., mayo-junio de 1994, 47 (2-3): 157-71; discusión: 171-3]. En resumen, las producciones fueron multiplicadas por PCR para introducir un sitio de restricción 5' para NcoI en el extremo 3' y un sitio de restricción para NotI. El producto fue purificado en gel, doblemente digerido con NotI y NcoI (New England Biolabs) y purificado en gel. Se ligó el producto digerido a pCANTAB6 digerido con NotI y NcoI y se transformó *E. coli* HB2151 (Biostat Diagnostics) con él. Las colonias individuales fueron clasificadas en placas de 96 pocillos para exploración y secuenciación.

30

#### Ejemplo 7

##### Exploración de variantes de G-CSF en una exploración de expresión primaria

35 Se ensayaron variantes de G-CSF en cuanto a expresión soluble en una exploración de expresión a pequeña escala en 96 pocillos. En resumen, se hizo que se expresaran proteínas variantes de G-CSF usando el vector de expresión pCANTAB6 y células de *E. coli* HB2151 (Biostat Diagnostics). La exploración de la expresión se llevó a cabo por triplicado en Master Blocks de 96 pocillos (Greiner Bio-One), que contenían 500 ml de caldo TY 2x, glucosa al 0,2% y ampicilina 100 mM en cada pocillo. Se inoculó 1 ml de disolución madre de variante de G-CSF/glicerol en cada pocillo salvo en los pocillos de la columna 12, en que se inoculó 1 ml de disolución madre de G-CSF de tipo silvestre/glicerol. Se incubaron las placas a 37 °C/600 rpm durante 6 horas en una incubadora HiGro (Genemachines, Inc.). Luego se añadió IPTG a cada pocillo hasta una concentración final de 1 mM y se incubaron las placas durante la noche a 37 °C/600 rpm. Se recolectaron las células por centrifugación a 2500 x g durante 10 minutos. El material periplásmico fue liberado resuspendiendo cada sedimento de centrifugación en 200 ml de Tris 200 mM, pH de 8,0, EDTA 1 mM, sacarosa 0,5 M y Tween al 0,1% a 4 °C e incubando sobre hielo durante 20 minutos. Se eliminaron los fragmentos celulares por centrifugación a 2500 x g durante 10 minutos. Se reunieron las tres muestras de cada clon y se cargaron 1400 ml en puntas Ni-NTA PhyNexus (PhyNexus, Inc.) de 20 ml de

45

capacidad. Se lavaron las puntas con 340 ml de Tris 50 mM, pH de 7,4, NaCl 300 mM y Tween al 0,1%, seguidos de 100 ml de Tris 50 mM, pH de 7,4, NaCl 300 mM, Tween al 0,1% e imidazol 30 mM. Luego se lavaron con 170 ml de Tris 50 mM, pH de 7,4, NaCl 300 mM y Tween al 0,1% antes de que el G-CSF unido fuera eluido usando HEPES 100 mM, pH de 3,0, NaCl 140 mM y Tween al 0,2%. Las muestras eluidas fueron neutralizadas con 25 ml de HEPES 200 mM, pH de 8,0. Se desarrollaron las muestras en geles NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen) al 12% en tampón de MES 1x y se tiñeron los geles usando el kit SilverXpress (Invitrogen) para tinción con plata.

Se exploraron ochenta y ocho variantes de G-CSF del ciclo 4 de la forma anteriormente descrita. De entre éstas, se identificó una variante de G-CSF con un perfil de expresión mejorado. El producto de esta variante era esencialmente una sola banda detectada mediante tinción con plata, en comparación con la producción casi indetectable del tipo silvestre (Figura 2).

#### Ejemplo 8

##### Expresión y purificación de variantes de G-CSF a gran escala

Se compararon las producciones periplásmicas a gran escala de una variante de G-CSF y del G-CSF de tipo silvestre. Se utilizó una sola colonia de cada G-CSF para inocular 400 ml de caldo TY 2x, glucosa al 0,2% y ampicilina 100 mM en un matraz cónico de 2 l de capacidad. Se incubaron los cultivos a 37 °C/300 rpm durante 6 horas antes de que se añadiera IPTG en una concentración final de 1 mM. Se incubaron los cultivos durante la noche a 37 °C/300 rpm. Se recolectaron las células por centrifugación a 16.800 x g durante 10 minutos. Se liberó el material periplásmico por resuspensión de cada sedimento de centrifugación en 25 ml de Tris 200 mM, pH de 8,0, EDTA 1 mM, sacarosa 0,5 M y Tween al 0,1% a 4 °C e incubación sobre hielo durante 20 minutos. Se eliminaron los fragmentos celulares por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. Las purificaciones se llevaron a cabo utilizando un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare). Para cada purificación, se hizo pasar la muestra periplásmica a través de una columna HisTrap HP (GE Healthcare) de 5 ml de capacidad que había sido equilibrada en Tris 50 mM, pH de 8,0, NaCl 300 mM y Tween al 0,1%. La columna fue lavada con 50 ml de Tris 50 mM, pH de 8,0, NaCl 300 mM, Tween al 0,1% e imidazol 30 mM antes de que el G-CSF unido fuera eluido usando Tris 50 mM, pH de 8,0, NaCl 300 mM, Tween al 0,1% e imidazol 200 mM. La muestra eluida fue luego desarrollada en una columna Superdex 75 16/30 (GE Healthcare) para filtración en gel que había sido equilibrada en PBS 2x y Tween al 0,1%.

La variante de G-CSF (Var. 1) produjo proteína monómera soluble, con una producción de 8 mg/l, como se muestra en la Figura 3. El tipo silvestre no produjo proteína monómera y produjo una pequeña cantidad, 8 µg/l, de G-CSF dímero o agregado (Figura 3).

#### Ejemplo 9

##### Actividad biológica del G-CSF

Se evaluó la actividad biológica de la variante y del tipo silvestre en un ensayo de proliferación de células OCI/AML5. Las células OCI/AML5 se obtuvieron de la German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ, Braunschweig; ACC 247) y se mantuvieron de acuerdo con los protocolos proporcionados. Los medios de ensayo comprendían MEMA que contenía suero bovino fetal al 16,6% (volumen/volumen). Antes de cada ensayo, se recogieron las células OCI/AML5 como sedimento de una centrifugación a 300 x g durante 5 minutos, se eliminaron los medios por aspiración y se resuspendieron las células en medios de ensayo. Se repitió este proceso tres veces más, con las células resuspendidas en una concentración final de  $1 \times 10^5$ /ml en medios de ensayo. Se diluyeron las variantes de G-CSF (por duplicado) en medios de ensayo hasta las concentraciones deseadas. Luego se añadieron 100 µl de células resuspendidas a cada punto de ensayo para obtener un volumen de ensayo total de 200 µl/pocillo. Se incubaron las placas de ensayo a 37 °C durante 72 horas bajo CO<sub>2</sub> al 5%. Luego se añadieron 20 µl de timidina tritiada ( $1,85 \times 10^{11}$  Bq/ml, NEN) a cada punto de ensayo y se volvió a poner las placas de ensayo en la incubadora durante otras 4 horas. Se recolectaron las células en placas con filtros de fibra de vidrio (Perkin Elmer) usando un recolector de células. Se determinó la incorporación de timidina usando un contador Packard TopCount de centelleo en estado líquido para microplacas. Se analizaron los datos utilizando el software Graphpad Prism.

La variante Var. 1 de G-CSF era más activa que el G-CSF de tipo silvestre en el ensayo de proliferación de células OCI/AML5 (Tabla 3):

Tabla 3. EC<sub>50</sub> del G-CSF de tipo silvestre (WT) y la variante Var. 1 en el ensayo de proliferación de células OCI/AML5

Muestra	EC <sub>50</sub> (nM)
WT	6
Var. 1	2,6

Análisis de la secuencia de la variante de G-CSF

Se secuenció la variante Var. 1. Se describe a continuación la secuencia de la variante como diferencias a nivel de aminoácido con respecto al G-CSF WT que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. nº 6.

Var. 1            C17G W58R Q70R F83L

ID. SEC. nº 1: secuencia de nucleótidos que codifica la EPO humana WT

5    ID. SEC. nº 2: secuencia de aminoácidos de la EPO humana WT

ES 2 379 189 T3

CCCCACCACGCTTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAG  
CGGGTGGTGCGAAGTAGACTGTGCGGCTCAGGACCTCTCCATGGAGAACCTCCGGTTC  
A P P R F I C D S R V L E R Y L L E A K  
10 20

GAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACT  
CTCCGGCTCTTATAGTGCTGCCCGACACGACTTGTGACGTGCGAACTTACTCTTATAGTGA  
E A E N I T T G C A E H C S L N E N I T  
30 40

GTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCCGGCAGCAGGCC  
CAGGGTCTGTGGTTTCAATTAAAGATACGGACCTTCTCCTACCTCCAGCCCGTCGTCCGG  
V P D T K V N F Y A W K R M E V G Q Q A  
50 60

GTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCTGCTCCTGCGGGGCCAGGCCCTG  
CATCTTCAGACCGTCCCGGACCGGGACGACAGCCTTCGACAGGACGCCCCGGTCCGGGAC  
V E V W Q G L A L L S E A V L R G Q A L  
70 80

TTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGT  
AACCAGTTGAGAAGGGTCGGCACCCCTCGGGGACGTCGACGTACACCTATTTCCGGCAGTCA  
L V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S  
90 100

GGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGAGGAAGCCATCTCC  
CCGGAAGCGTCGGAGTGGTGAGACGAAGCCCCGAGACCCTCGGGTCTCCTTCGGTAGAGG  
G L R S L T T L L R A L G A Q E E A I S  
110 120

CCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCGGCAA  
GGAGGTCTACGCCGGAGTCGACGAGGTGAGGCTTGTTAGTGACGACTGTGAAAGGCGTTT  
P P D A A S A A P L R T I T A D T F R K  
130 140

CTCTCCGAGTCTACTCCAATTCCTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCC  
GAGAAGGCTCAGATGAGGTTAAAGGAGGCCCTTTCGACTTCGACATGTGTCCCCTCCGG  
L F R V Y S N F L R G K L K L Y T G E A  
150 160

TGCAGGACAGGGGACAGA

ACGTCCTGTCCCCTGTCT

C R T G D R

ES 2 379 189 T3

ID. SEC. nº 4: secuencia de aminoácidos del GM-CSF humano WT

GCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAG  
CGTGGGCGGGCGAGCGGGTGGGGTTCGTGCGTGGGACCCTCGTACACTTACGGTAGGTC  
A P A R S P S P S T Q P W E H V N A I Q>  
10 20

GAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTA  
CTCCGGGCGCGAGAGGACTTGGACTCATCTCTGTGACGACGACTCTACTTACTTTGTCAT  
E A R R L L N L S R D T A A E M N E T V>  
30 40

GAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAG  
CTTCAGTAGAGTCTTTACAAACTGGAGTCCCTCGGCTGGACGGATGTCTGGGCGGACCTC  
E V I S E M F D L Q E P T C L Q T R L E>  
50 60

CTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCGCCCTACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATG  
GACATGTTTCGTCCCGGACGCCCCGTCGGAGTGGTTCGAGTTCGCGGGGAACTGGTACTAC  
L Y K Q G L R G S L T K L K G P L T M M>  
70 80

GCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATT  
CGGTCGGTGATGTTTCGTGCGTACGGGAGGTTGGGGCCTTTGAAGGACACGTTGGGTCTAA  
A S H Y K Q H C P P T P E T S C A T Q I>  
90 100

ATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTGTCATCCCCTTTGAC  
TAGTGGAACCTTTCAAAGTTTCTCTTGGACTTCCTGAAAGACGAACAGTAGGGGAAACTG  
I T F E S F K E N L K D F L L V I P F D>  
110 120

TGCTGGGAGCCAGTCCAGGAG  
ACGACCCTCGGTCAGGTCCTC  
C W E P V Q E>

ID. SEC. nº 5: secuencia de nucleótidos que codifica el G-CSF humano WT

ID. SEC. nº 6: secuencia de aminoácidos del G-CSF humano WT

ES 2 379 189 T3

ACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAA  
TGGGGGGACCCGGGACGGTCGAGGGACGGGGTCTCGAAGGACGAGTTCACGAATCTCGTT  
T P L G P A S S L P Q S F L L K C L E Q  
10 20

GTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAG  
CACTCCTTCTAGGTCCCCTACCGCGTCGCGAGGTCTCTTCGACACACGGTGGATGTTC  
V R K I Q G D G A A L Q E K L C A T Y K  
30 40

CTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCC  
GACACGGTGGGGCTCCTCGACCACGACGAGCCTGTGAGAGACCCGTAGGGGACCCGAGGG  
L C H P E E L V L L G H S L G I P W A P  
50 60

CTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGC  
GACTCGTCGACGGGGTCCGGTCCGGGACGTCCGACCGTCCGACGAACTCGGTTGAGGTATCG  
L S S C P S Q A L Q L A G C L S Q L H S  
70 80

GGCCTTTTCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTTGGGT  
CCGGAAGAGGATGGTCCCCGAGGACGTCCGGGACCTTCCCTAGAGGGGGCTCAACCCA  
G L F L Y Q G L L Q A L E G I S P E L G  
90 100

CCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCCGCCACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAG  
GGGTGGAACCTGTGTGACGTTCGACCTGCAGCGGCTGAAACGGTGGTGGTAGACCGTCGTC  
P T L D T L Q L D V A D F A T T I W Q Q  
110 120

ATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTC  
TACCTTCTTGACCCTTACCGGGGACGGGACGTCCGGTGGGTCCCACGGTACGGCCGGAAG  
M E E L G M A P A L Q P T Q G A M P A F  
130 140

ES 2 379 189 T3

GCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTC  
CGGAGACGAAAGGTGCGCGCCCGTCTCTCCCAGGACCAACGGAGGGTAGACGTCTCGAAG  
A S A F Q R R A G G V L V A S H L Q S F  
150 160

CTGGAGGTGTCGTACCGGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCCC  
GACCTCCACAGCATGGCGCAAGATGCGGTGGAACGGGTCTGGG  
L E V S Y R V L R H L A Q P  
170

## REIVINDICACIONES

1. Un método para proporcionar una variante de polipéptido objetivo con una estabilidad mejorada en comparación con un polipéptido objetivo parental, método que comprende:
- 5 (a) proporcionar moléculas de mRNA, comprendiendo cada molécula de mRNA una secuencia de nucleótidos que codifica una variante del polipéptido objetivo y que carece de un codón de parada en marco;
- (b) incubar las moléculas de mRNA bajo unas condiciones para la traducción ribosómica de las moléculas de mRNA para producir variantes codificadas del polipéptido objetivo, por lo cual se forman complejos que comprenden mRNA, la variante codificada del polipéptido objetivo y el ribosoma;
- 10 (c) poner los complejos en contacto con un receptor, ligando o miembro específico de par ligante que se unen al polipéptido objetivo parental y seleccionar uno o más complejos cada uno de los cuales presenta una variante del polipéptido objetivo capaz de unirse al receptor, ligando o miembro específico de par ligante bajo las condiciones de la selección;
- caracterizado por que** se aplica una presión de selección en cuanto a estabilidad, ditioneitol (DTT), durante la traducción en la operación (b) y se continúa aplicando durante la selección en la operación (c), y se aplican otras presiones de selección en cuanto a estabilidad, HIC y temperatura ambiental, durante la selección en la operación (c), o se aplican después de la traducción en la operación (b) y se eliminan antes de poner los complejos en contacto con el receptor, ligando o miembro específico de par ligante en la operación (c); y
- 15 (d) determinar la estabilidad de la variante o las variantes del polipéptido objetivo seleccionadas, por lo que se obtienen una o más variantes del polipéptido objetivo con una estabilidad mejorada en comparación con la del polipéptido objetivo parental.
- 20 2. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la estabilidad se determina comparando la capacidad de la variante o las variantes del polipéptido objetivo seleccionadas para unirse al receptor, ligando o miembro específico de par ligante en la presentación cuando se producen en presencia y ausencia de DTT.
- 25 3. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la estabilidad se determina comparando la agregación de la variante o las variantes del polipéptido objetivo seleccionadas con la del polipéptido objetivo parental.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que las moléculas de mRNA para incubación en el sistema de traducción se proporcionan mutando ácido nucleico que codifica el polipéptido objetivo parental.
- 30 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que las moléculas de mRNA para incubación en el sistema de traducción se proporcionan por medio de reacciones RT-PCR en que al menos un cebador de RT-PCR es un cebador mutagénico que codifica una diversidad de secuencias diferentes para inclusión en una región definida de la secuencia de nucleótidos que codifica una variante del polipéptido objetivo.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además recuperar mRNA de un complejo seleccionado.
- 35 7. Un método para producir una variante polipeptídica, método que comprende:
- llevar a cabo el método de acuerdo con la Reivindicación 6;
- multiplicar y copiar el mRNA recuperado en DNA que codifica la variante del polipéptido objetivo seleccionada;
- 40 proporcionar el DNA en un sistema de expresión para la producción de un producto, producto que es la variante del polipéptido objetivo seleccionada o una cadena polipeptídica de la variante del polipéptido objetivo seleccionada; y
- aislar o purificar el producto.
8. Un método para producir una variante polipeptídica, método que comprende:
- llevar a cabo el método de acuerdo con la Reivindicación 6;
- 45 multiplicar y copiar el mRNA recuperado en DNA que codifica la variante del polipéptido objetivo seleccionada; y
- proporcionar el DNA que codifica la variante del polipéptido objetivo seleccionada o una cadena polipeptídica de la variante del polipéptido objetivo seleccionada, dentro de una secuencia de nucleótidos para proveer una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la variante del polipéptido

objetivo seleccionada, o una cadena polipeptídica de la variante del polipéptido objetivo seleccionada, fusionada con aminoácidos adicionales;

proporcionar el DNA que comprende dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en un sistema de expresión para la producción de un producto, producto que es la proteína de fusión; y

- 5           aislar o purificar el producto.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el polipéptido objetivo parental es una molécula de anticuerpo.
10. Un método de acuerdo con la Reivindicación 9, en que la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo de cadena sencilla.
- 10    11. Un método de acuerdo con la Reivindicación 10, en que la molécula de anticuerpo es una molécula de scFv, V<sub>H</sub>, Fd o dAb.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en que el polipéptido objetivo parental es un miembro de la familia de proteínas con haces de cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas.
- 15    13. Un método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en que el polipéptido objetivo parental es un dominio extracelular de un receptor complejo.

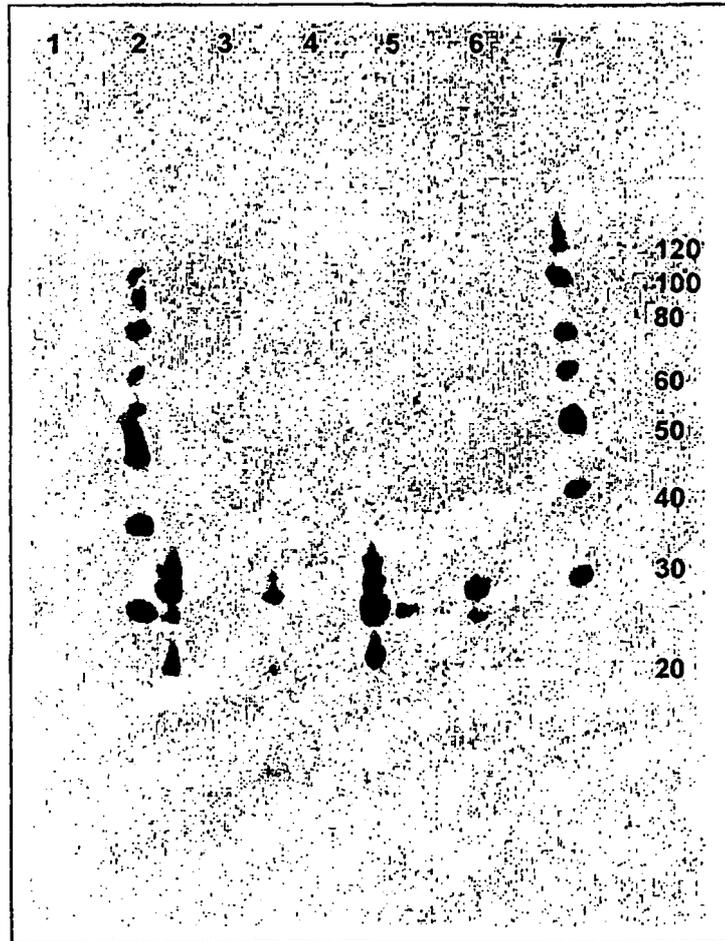


Figura 1

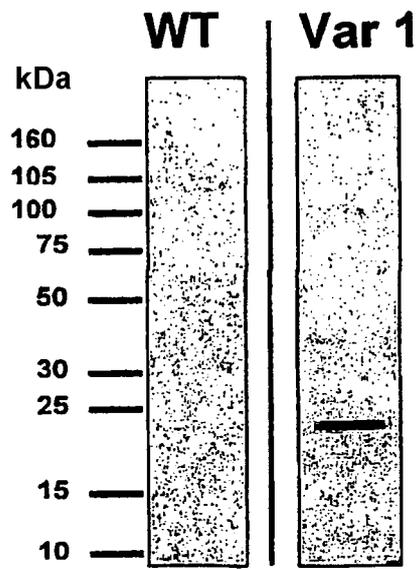


Figura 2

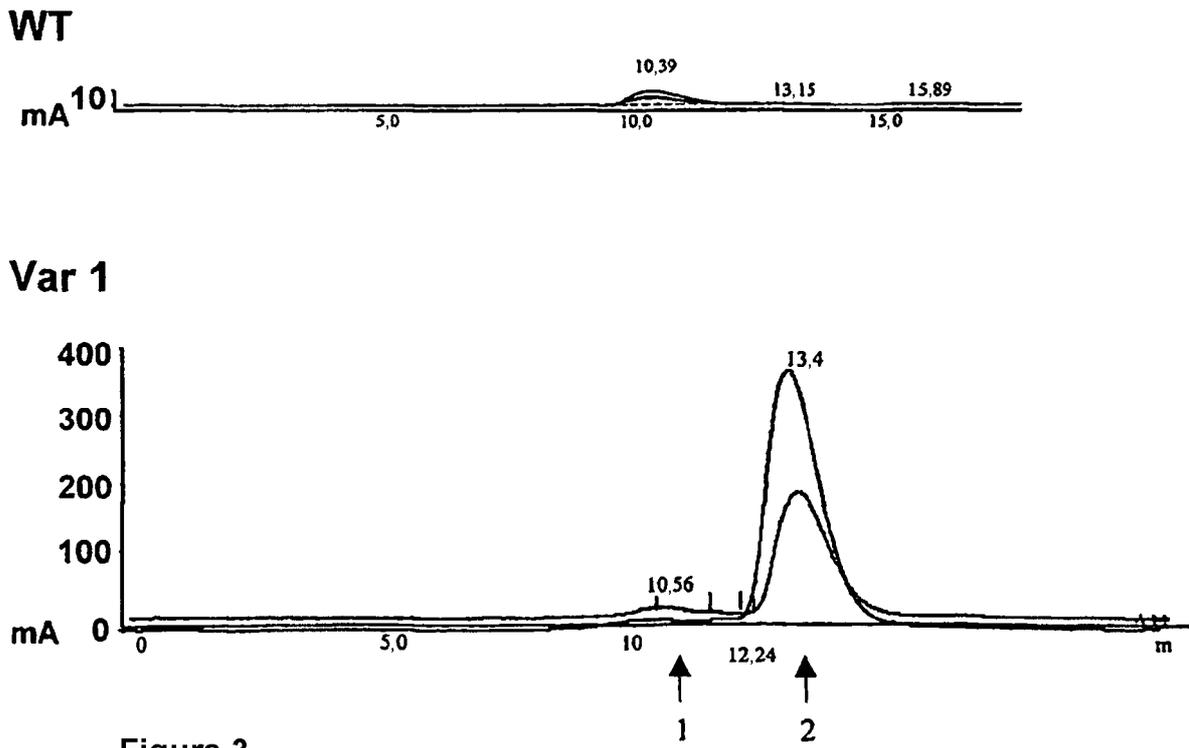


Figura 3