

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 574**

51 Int. Cl.:
C07K 1/04 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
C40B 30/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08865685 .5**
96 Fecha de presentación: **22.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2231693**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **Bibliotecas de polipéptidos con un almacén predeterminado**

30 Prioridad:
21.12.2007 EP 07150394
26.12.2007 US 9171 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2012

73 Titular/es:
AFFIBODY AB
BOX 20137
161 02 BROMMA, SE

72 Inventor/es:
ABRAHMSÉN, Lars;
HERNE, Nina;
LENDEL, Christofer y
FELDWISCH, Joachim

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 574 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

Bibliotecas de polipéptidos con un armazón predeterminado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevas poblaciones de variantes polipeptídicas basadas en un armazón común. Estas poblaciones pueden entre otras usarse para proporcionar nuevas proteínas y polipéptidos de unión.

Antecedentes

Se han descrito diferentes procedimientos para la construcción de nuevas proteínas de unión (Nygren PA y Uhlén M (1997) *Curr Opin Struct Biol* 7: 463-469). Una estrategia ha sido combinar la generación de bibliotecas y exploración o selección con respecto a propiedades deseadas.

10 Se han descrito moléculas Affibody® originales, poblaciones de tales moléculas y armazones de tales moléculas entre otros en el documento WO 95/19374, la enseñanza del cual se incorpora en el presente documento por referencia.

15 En algunas aplicaciones, se desean proteínas, polipéptido o moléculas Affibody®, poblaciones de tales moléculas y armazones con propiedades mejoradas, tales como estabilidad alcalina, baja antigenicidad, estabilidad estructural, susceptibilidad de síntesis química e hidrofilia.

Estabilidad alcalina

20 La producción de agentes farmacéuticos proteicos y reactivos de biotecnología requiere varias etapas de purificación para enriquecer con respecto a producto específico mientras se retiran contaminantes no deseados. La purificación de afinidad mediada por matrices de afinidad proteínicas tales como anticuerpos monoclonales y proteína A Estafilocócica (SpA) permite la purificación eficaz en una etapa. Sin embargo, para hacer esto rentable es deseable poder regenerar de forma apropiada las matrices de afinidad. Esto habitualmente implica un procedimiento conocido como limpieza in situ (CIP), en el que los agentes, con frecuencia soluciones alcalinas, se usan para eluir contaminantes.

25 También se requiere estabilidad alcalina con indicadores de captura de imágenes moleculares para marcar con el núclido de SPECT más habitual tecnecio-99m, y para permitir que se realicen algunos otros tipos de modificaciones químicas.

Baja antigenicidad

30 Los compuestos farmacéuticos basados en proteínas, tales como anticuerpos monoclonales terapéuticos y moléculas Affibody®, tienen el potencial de inducir respuestas inmunes no deseadas en seres humanos. Los principales factores que contribuyen a la inmunogenicidad son presencia de impurezas, agregados proteicos, epítomos ajenos por ejemplo nuevos idiotipos, diferentes alotipos de Ig o secuencias no propias. Además, las interacciones de inmunoglobulina (Ig) de reacción cruzada aumentarán muy posiblemente la probabilidad de generar una respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos T específicos frente al producto farmacéutico proteico. Para minimizar el riesgo de interacción no deseada con el sistema inmune es deseable eliminar los epítomos inmunes existentes por ingeniería proteica del producto farmacéutico.

35 Las moléculas Affibody® derivan de la proteína A estafilocócica (SpA), que es un receptor asociado a pared celular en la superficie de la bacteria Gram positiva *Staphylococcal aureus*. De forma más precisa, SpA está compuesta de cinco dominios altamente homólogos que se unen todos a inmunoglobulinas de muchas especies de mamífero incluyendo seres humanos. Cada dominio de SpA interacciona con Ig humanas de dos maneras diferentes; por unión directa con Fc γ incluyendo IgG1, IgG2 e IgG4 (Langone JJ (1982) *Adv Immunol* 32: 157-252), o por unión con miembros de la familia de VH3 (Silverman GJ y col (1992) *Int Rev Immunol* 9: 57-78). El armazón común de las moléculas Affibody® originales es idéntico al dominio B de SpA con la excepción de la mutación G29A, que se incluyó para aumentar la estabilidad proteica y para eliminar un sitio de escisión de hidroxilamina, y la mutación A1V, introducida en una región espaciadora entre los dominios (Nilsson B y col (1987), *Prot Eng* 1: 107-113). Los restos aminoacídicos en SpA que se han implicado en la interacción con Fc γ y VH3 se conocen bien y se han descrito en la bibliografía (Graille M y col (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 5399-5404). Se construyó una biblioteca molecular de diferentes moléculas Affibody® seleccionando aleatoriamente restos superficiales en una cara de la molécula, incluyendo restos que se sabe que están implicados en la interacción con Fc γ , eliminando de este modo la afinidad por Fc γ .

50 *Estabilidad estructural*

Uno de los factores clave para el éxito de productos farmacéuticos proteicos y peptídicos es la estabilidad de la proteína. Las proteínas que muestran alta estabilidad estructural soportarán con más probabilidad funcionalmente las modificaciones químicas y proteólisis durante la producción así como dentro del cuerpo humano. Además, la

estabilidad influirá en el periodo de caducidad de los productos farmacéuticos peptídicos o proteicos así como la vida activa del producto farmacéutico o proteico dentro del cuerpo humano.

Susceptibilidad de síntesis química

5 Los investigadores han obtenido tradicionalmente proteínas por procedimientos biológicos pero la síntesis química de péptidos y proteínas pequeñas es una estrategia complementaria potente y se usa habitualmente en la biología estructural, ingeniería proteica e investigación biomédica. La síntesis química de proteínas ofrece una manera rápida y eficaz de producir proteínas homogéneas sin contaminantes biológicos tales como impurezas de ADN y proteínas de la célula huésped. Además, se aumenta la flexibilidad puesto que la síntesis química permite la incorporación de aminoácidos no naturales, modificaciones químicas e introducción de sondas bioquímicas y biofísicas. El éxito de la síntesis química de péptidos y proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la molécula en cuestión. 10 Ciertos restos aminoacídicos muestran baja eficacia de acoplamiento, lo que significa que necesitan optimizarse varias etapas durante la síntesis lo que es un procedimiento que consume tiempo sin éxito garantizado. Además, los aminoácidos difíciles de introducir eficazmente durante la síntesis química tendrán mayor impacto negativo en el rendimiento proteico cuanto más larga sea la secuencia proteica.

15 *Aumento de la hidrofilia*

Para la mayoría de las aplicaciones es deseable que los péptidos y proteínas sean altamente solubles, mostrando una baja tendencia a agregarse. Tales características proteicas son especialmente importantes cuando se trata de productos farmacéuticos proteicos. Existe una fuerte correlación positiva entre la hidrofobicidad de superficie proteica y la baja solubilidad y tendencia aumentada a agregarse.

20 **Descripción de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar una población de variantes polipeptídicas basadas en nuevos armazones.

Estos nuevos armazones tienen varias ventajas en comparación con armazones similares conocidos, denominados armazones originales. Las ventajas también se aplican a polipéptidos obtenidos con el uso de estos nuevos armazones. Estas ventajas se analizarán en más detalle posteriormente, pero se proporcionan algunos ejemplos en el presente documento. Por ejemplo, se ha realizado investigación exhaustiva para desarrollar los nuevos armazones polipeptídicos que muestran alta estabilidad en un ambiente alcalino. Un aspecto de la estabilidad alcalina es estabilidad frente a desamidación de asparaginas. Evitar esta reacción mediante rigidez estructural aumentada o reemplazando este resto también proporciona estabilidad química que contribuye a obtener un producto homogéneo, por ejemplo después de producción en un procedimiento de fermentación o almacenamiento, en el que la desamidación de asparaginas contribuye en gran medida a una mezcla heterogénea que es difícil de separar. 25

Además, se obtuvo un perfil mejorado con respecto a baja antigenicidad (poca unión a IgG) por eliminación en la nueva secuencia de armazón de la afinidad restante con respecto a inmunoglobulinas, principalmente mediada por VH3. 30

Además, los nuevos armazones se han modificado por ingeniería genética de modo que muestren alta estabilidad estructural con respecto a una estructura alfa helicoidal fácilmente plegada, alta temperatura de fusión y supresión de sitios que se sabe que se dirigen a proteólisis.

Los armazones de molécula Affibody[®] original contienen varios aminoácidos que se ha mostrado que reducen la velocidad y éxito de síntesis química. Para tener un procedimiento de producción de proteína Affibody[®] eficaz, es decir de alto rendimiento y alta producción, se intercambiaron numerosos aminoácidos por restos con propiedades más compatibles con la síntesis química. 40

Para mejorar la hidrofilia y solubilidad, se han sustituido restos hidrófobos en la superficie del armazón de moléculas Affibody[®] por aminoácidos más hidrófilos.

45 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una población de polinucleótidos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una combinación de una población de polipéptidos y una población de polinucleótidos.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para seleccionar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada de una población de polipéptidos.

50 Otro objeto es proporcionar un procedimiento para aislar un polinucleótido que codifique un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada.

Otro objeto es proporcionar un procedimiento para identificar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada.

Un objeto adicional es proporcionar un procedimiento para seleccionar e identificar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada.

Un objeto relacionado es proporcionar un procedimiento para producción de un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada.

- 5 Las poblaciones y procedimientos de acuerdo con la invención permiten la provisión (incluyendo producción y evaluación) de agentes con una afinidad por una diana predeterminada, a través de la provisión de un polipéptido que se caracteriza por unión específica con la diana predeterminada.

También es posible proporcionar polipéptidos que se unen a una diana predeterminada que muestra poca o ninguna unión no específica.

- 10 También es posible proporcionar polipéptidos que se unen a una diana predeterminada que puede usarse fácilmente como un resto en un polipéptido de fusión.

Además, es posible proporcionar polipéptidos que se unan a una diana predeterminada que resuelva uno o más de los problemas conocidos experimentados con reactivos de anticuerpo existentes.

- 15 Además, es posible proporcionar polipéptidos que se unan a una diana predeterminada que sean susceptibles de uso en aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico.

También es posible proporcionar polipéptidos que se unan a una diana predeterminada que se preparan fácilmente por síntesis peptídica química.

Además, la invención permite la identificación de polipéptidos que se unen a una diana predeterminada que muestra una estabilidad mejorada frente a agentes conocidos que se unen a la misma diana.

- 20 También es posible proporcionar polipéptidos que se unan a una diana predeterminada que muestren baja antigenicidad cuando se usan *in vivo* en un mamífero y/o que muestran una biodistribución mejorada tras su administración a un mamífero.

Estos y otros objetos se cumplen por los diferentes aspectos de la invención como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas.

- 25 En un primer aspecto la invención proporciona una población de variantes polipeptídicas basadas en un armazón común, comprendiendo cada polipéptido en la población la secuencia de aminoácidos de armazón **EXXXAXXEIX XLPNLTXQXXAFIXKLXDDPSQSSELLSE AKKLNDSQ**, (SEC ID N°: 1).

o en algunos casos más preferentemente

**AKYAKEXXAXX EIXXLPNLTX QXXAFIXKL XDDPSQSSEL
LSEAKKLNDS Q,
(SEC ID N°: 2).**

- 30 En las secuencias anteriores cada **X** individualmente corresponde a un resto aminoacídico que se varía en la población.

La población consiste en un gran número de variantes de tales moléculas polipeptídicas. En este contexto un número grande significa una población que comprende al menos 1×10^4 moléculas polipeptídicas únicas, al menos 1×10^6 , al menos 1×10^8 , al menos 1×10^{10} , al menos 1×10^{12} o al menos 1×10^{14} moléculas polipeptídicas unidas.

- 35 Sin embargo, es necesario usar un grupo que sea suficientemente grande para proporcionar el tamaño deseado de la población. La "población" descrita en el presente documento puede también indicarse como "biblioteca".

Se ha indicada anteriormente que cada **X** corresponde individualmente a un resto aminoacídico que varía. Esto significa que cada **X** puede ser un resto aminoacídico independiente de la identidad de cualquier otro resto indicado como **X** en la secuencia. En la secuencia de aminoácidos de armazón los diferentes aminoácidos **X** variados pueden

- 40 seleccionarse de los 20 restos aminoacídicos de origen natural de tal modo que cualquiera de estos 20 restos aminoacídicos de origen natural puede estar presente en la posición **X** correspondiente en cualquier variante dada. La selección de restos aminoacídicos en cada posición es más o menos aleatoria. También es posible limitar el grupo del que se seleccionan los diferentes restos aminoacídicos variados a 19, 18, 17, 16 o menos de los 20 restos aminoacídicos de origen natural. La variabilidad en diferentes posiciones puede ajustarse individualmente, entre uno,

- 45 lo que significa sin selección aleatoria, hasta los 20 aminoácidos. La introducción aleatoria de un subconjunto más pequeño de aminoácidos puede obtenerse por selección cuidadosa de las bases desoxirribonucleotídicas introducidas, por ejemplo, los codones T(A/C)C pueden introducirse para obtener una introducción aleatoria de serina o tirosina en una posición dada en la cadena polipeptídica. De forma similar, los codones (T/C/A/G)CC pueden introducirse para obtener una introducción aleatoria de fenilalanina, leucina, alanina y valina en una posición

dada en la cadena polipeptídica. El experto en la materia es consciente de muchas alternativas de combinaciones de bases desoxirribonucleotídicas que pueden usarse para obtener diferentes combinaciones de aminoácidos en una posición dada en la cadena polipeptídica. El conjunto de aminoácidos que puede aparecer en una posición dada en la cadena polipeptídica también puede determinarse por la introducción de trinucleótidos durante la síntesis de oligonucleótidos, en lugar de una base desoxirribonucleotídica cada vez.

Los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos del armazón proporcionadas anteriormente son nuevas moléculas Affibody[®]. Como tales, derivan de la proteína A estafilocócica (SpA). En este contexto “derivado” no significa que los polipéptidos en sí mismos de ninguna manera se originen necesariamente directamente de SpA. En su lugar significa que el armazón tienen una semejanza secuencial y estructural con un dominio de SpA, en el que se conservan los aminoácidos en el núcleo hidrófobo de la proteína de tres haces helicoidales.

Diferentes modificaciones de, y/o adiciones a, los polipéptidos que constituyen la población de acuerdo con la invención pueden realizarse para adaptar los polipéptidos al uso específico pretendido, sin alejarse del alcance de la presente invención. Tales modificaciones y adiciones se describen en más detalles posteriormente, y pueden comprender aminoácidos adicionales comprendidos en la misma cadena polipeptídica, o marcadores y/o agentes terapéuticos que se conjugan de forma química o se unen de otro modo a los polipéptidos que constituyen la población. En algunas realizaciones pueden preferirse restos aminoacídicos adicionales en el extremo C terminal. Estos restos aminoacídicos adicionales pueden desempeñar un papel en la unión del polipéptido, pero pueden servir igualmente bien otros fines, relacionados por ejemplo con uno o más de la producción, purificación, estabilización, acoplamiento o detección del polipéptido. Tales restos aminoacídicos adicionales pueden comprender uno o más restos aminoacídicos añadidos para fines de acoplamiento químico. Un ejemplo de esto en la adición de un resto de cisteína en la primera o última posición en la cadena polipeptídica, es decir en el extremo N o C terminal. También puede introducirse un resto de cisteína para usarse para acoplamiento químico mediante reemplazo de otros aminoácidos en la superficie del dominio proteico, preferentemente en una parte de la superficie que no está implicada en la unión a diana. Tales restos aminoacídicos adicionales pueden comprender también un “marcador” para purificación o detección del polipéptido, tal como un marcador de hexahistidilo (His₆), o un marcador “myc” o un marcador “FLAG” para interacción con anticuerpos específicos del marcador. El experto en la materia es consciente de otras alternativas.

Los “restos aminoacídicos adicionales” analizados anteriormente también pueden constituir uno o más dominios polipeptídicos con cualquier función deseada, tal como otra función de unión, una función enzimática, una función quelante de iones metálicos o una función fluorescente o mezclas de las mismas.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una población de polinucleótidos. Cada polinucleótido en esta población codifica un miembro de una población de polipéptidos descrito anteriormente.

En un tercer aspecto la invención proporciona una combinación de una población de polipéptidos de acuerdo con la invención y una población de polinucleótidos de acuerdo con la invención en la que cada miembro de la población de polipéptidos se asocia física o espacialmente con el polinucleótido que codifica ese miembro mediante medios para acoplamiento genotipo-fenotipo. Esta asociación física o espacial será más o menos estricta, dependiendo del sistema usado.

El medio para acoplamiento genotipo-fenotipo puede comprender un sistema de presentación de fagos. Los sistemas de presentación de fagos se conocen bien por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Smith GP (1985) Science 228: 1315-1317 y Barbas CF y col (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88: 7978-7982.

Además, los medios para acoplamiento de genotipo-fenotipo pueden comprender un sistema de presentación en superficie celular. El sistema de presentación de superficie celular puede comprender células procariotas, tales como células Gram⁺ o células eucariotas, tales como células de levadura. Los sistemas de presentación en superficie celular se conocen bien por los expertos en la materia. Los sistemas procariotas se describen, por ejemplo, en Francisco JA y col (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90: 10444-10448 y Lee SY y col (2003) Trends Biotechnol 21: 45-52. Los sistemas eucariotas se describen, por ejemplo, en Boder ET y col (1997) Nat Biotechnol 15: 553-557 y Gai SA y col (2007) Curr Opin Struct Biol 17: 467-473.

Además, los medios para acoplamiento genotipo-fenotipo pueden comprender un sistema de presentación sin células. El sistema de presentación sin células puede comprender un sistema de presentación de ribosomas, un sistema de presentación de compartimentación *in vitro*, un sistema para la presentación en *cis* o un sistema de presentación de micropérlas. Los sistemas de presentación de ribosomas se conocen bien por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Mattheakis LC y col (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91: 9022-9026 y Zahnd C y col (2007) Nat Methods 4: 269-279. Los sistemas de compartimentación *in vitro* se conocen bien por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Sepp A y col (2002) FEBS Lett 532: 455-458. Los sistemas de presentación en *cis* se conocen bien por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Odegrip R y col (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101: 2806-2810. Los sistemas de presentación en micropérlas se conocen bien por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Nord O y col (2003) J Biotechnol 106: 1-13.

Además, los medios para acoplamiento genotipo-fenotipo pueden comprender un sistema sin presentación tal como el ensayo de complementación de fragmento-proteína (PCA). Los sistemas de PCA se conocen bien por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Koch H y col (2006) J Mol Biol 357: 427-441.

5 En un cuarto aspecto la invención proporciona un procedimiento para seleccionar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada de una población de polipéptidos, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una población de polipéptidos como se ha descrito anteriormente;
- (b) poner la población de polipéptidos en contacto con la diana predeterminada en condiciones que permitan la interacción específica entre la diana y al menos un polipéptido deseado que tenga una afinidad por la diana; y
- 10 (c) seleccionar, basándose en dicha interacción específica, el al menos un polipéptido deseado de la población restante de polipéptidos.

Este procedimiento se denomina posteriormente el procedimiento de selección de acuerdo con la invención.

15 La etapa (a) puede comprender las etapas preparatorias de proporcionar una población de nucleótidos y expresar dicha población de polinucleótidos para producir dicha población de polipéptidos. El medio para producir una población de polipéptidos varía dependiendo del sistema de presentación usado y pueden encontrarse ejemplos de tales medios en las referencias de genotipo-fenotipo anteriores. Cada miembro de dicha población de polipéptidos usado en el procedimiento de selección de acuerdo con la invención puede asociarse físicamente con el polinucleótido que codifica ese miembro por medio de acoplamiento genotipo-fenotipo. El medio para acoplamiento de genotipo-fenotipo puede ser uno de los analizados anteriormente.

20 La etapa (b) comprende las etapas de poner la población de polipéptidos en contacto con la diana predeterminada en condiciones que permitan la interacción específica entre la diana y al menos un polipéptido deseado que tenga una afinidad por la diana. La serie de condiciones aplicables se determina por la robustez de la diana, la robustez del sistema de presentación y por las propiedades deseadas de la interacción con la diana. Por ejemplo, puede desearse un procedimiento específico para separar la interacción tal como acidificación a un pH predeterminado. El experto en la materia conoce qué experimentos se requieren para determinar las condiciones adecuadas.

25 La etapa (c) comprende la selección de al menos un polipéptido. El medio para selección de polipéptido deseado de la población restante, basado en la interacción específica entre la diana predeterminada y al menos un polipéptido deseado que tenga afinidad por la diana varía dependiendo del sistema de presentación usado y puede encontrarse en las referencias genotipo-fenotipo anteriores. Por ejemplo, los sistemas de selección de presentación *in vitro* son sin células a diferencia de los sistemas tales como presentación de fagos y el ensayo de compartimentalización del fragmento proteico.

30 En un quinto aspecto la invención proporciona un procedimiento para aislar un polinucleótido que codifica un polipéptido deseado que tiene una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- seleccionar dicho polipéptido deseado y el polinucleótido que lo codifica a partir de una población de polipéptidos usando el procedimiento de selección de acuerdo con la invención basándose en el uso de dichos armazones y
- aislar el polinucleótido separado de este modo que codifica el polipéptido deseado.

Este procedimiento se denomina posteriormente el procedimiento de aislamiento de acuerdo con la invención.

40 La separación del polinucleótido del polipéptido puede realizarse de forma diferente dependiendo del sistema de presentación usado para selección. Por ejemplo, en los sistemas de presentación sin células tales como presentación en *cis* y presentación de ribosomas el polinucleótido o el ARNm correspondiente se recuperan a través de elución eficaz del polipéptido usando medios descritos en las referencias de genotipo-fenotipo anteriores.

45 El aislamiento del polinucleótido puede realizarse por diferentes procedimientos dependiendo del sistema de presentación usado para la selección. En la mayoría de los sistemas de selección descritos habitualmente, por ejemplo el ensayo de complementación de fragmento proteico, el polinucleótido puede aislarse directamente por amplificación por PCR específica usando oligonucleótidos apropiados. Excepcionalmente, como en la presentación de ribosomas, el polinucleótido puede aislarse a partir del ARNm correspondiente usando transcripción inversa. Los diversos medios para aislamiento del polinucleótido pueden hallarse en las referencias genotipo-fenotipo anteriores.

50 En un sexto aspecto la invención proporciona un procedimiento para identificar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- aislar un polinucleótido que codifica dicho polipéptido deseado usando el procedimiento de aislamiento de acuerdo con la invención; y
- secuenciar el polinucleótido para establecer por deducción la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido deseado.

La secuenciación del polinucleótido puede realizarse de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos por el experto en la materia.

En un séptimo aspecto la invención proporciona un procedimiento para seleccionar e identificar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada de una población de polipéptidos, que comprende las etapas de:

- 5
- (a) sintetizar cada miembro de la población de polipéptidos en un vehículo o perla separada;
 - (b) seleccionar o enriquecer los vehículos o perlas basándose en la interacción del polipéptido con la diana predeterminada; y
 - (c) identificar el polipéptido por metodología de caracterización proteica. En la etapa (c), es por ejemplo posible usar análisis espectrométrico de masas.
- 10

Este procedimiento se denomina posteriormente procedimiento de selección e identificación de acuerdo con la invención.

En un octavo aspecto la invención proporciona un procedimiento para producción de un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- 15
- seleccionar e identificar un polipéptido deseado usando el procedimiento de selección de acuerdo con la invención o el procedimiento de selección e identificación de acuerdo con la invención usando dichos armazones, y
 - producir dicho polipéptido deseado.

Este procedimiento se denomina posteriormente procedimiento de producción de acuerdo con la invención.

- 20
- En el procedimiento de producción de acuerdo con la invención la producción puede llevarse a cabo usando expresión recombinante de un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. La producción también puede llevarse a cabo usando síntesis química del polipéptido deseado *de novo*.

En un noveno aspecto la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- 25
- (a1) aislar un polinucleótido que codifica dicho polipéptido deseado usando el procedimiento de aislamiento de acuerdo con la invención; o
 - (a2) retrotraducir un polipéptido identificado usando el procedimiento de selección e identificación de acuerdo con la invención; y
 - (b) expresar el polinucleótido aislado de este modo para producir dicho polipéptido deseado,

- 30
- en el que la etapa (b) se realiza después de la etapa (a1) o la etapa (a2).

La expresión del polinucleótido puede realizarse en cualquier huésped de expresión adecuado conocido por el experto en la materia tal como pero sin limitación células bacterianas, células de levadura, células de insecto o células de mamífero.

- 35
- Las expresiones como "afinidad de unión por una diana predeterminada", "unión con una diana predeterminada" y similares se refieren a una propiedad de un polipéptido que puede medirse directamente a través de la determinación de las constantes de afinidad, es decir la cantidad de polipéptido que se asocia y disocia a una concentración de antígeno dada. Pueden usarse diferentes procedimientos para caracterizar la interacción molecular, tales como, pero sin limitación, análisis de competición, análisis de equilibrio y análisis microcalorimétrico y análisis de interacción en tiempo real basado en interacción de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo usando un instrumento Biacore®). Estos procedimientos se conocen bien por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Neri D y col (1996) *Tibtech* 14: 465-470 y Jansson M y col (1997) *J Biol Chem* 272: 8189-8197.
- 40

Los inventores de la presente invención han descubierto que un polipéptido que se une a una diana predeterminada, obtenida por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente pueden mostrar una o más ventajas sorprendentes, en comparación con polipéptidos conocidos que se unen a la misma diana, mientras que conservan la capacidad de los polipéptidos previamente conocidos para unirse a la diana. Son ejemplos no limitantes de tales ventajas los siguientes:

- 45
- Un polipéptido, que se une a una diana predeterminada y se obtiene por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, comprende menos restos aminoácidos que podrían provocar problemas, tales como bajo rendimiento y tasa de éxito, en síntesis química de la secuencia polipeptídica, tal como asparagina, arginina, ácido aspártico y metionina.
 - Un polipéptido, que se una a una diana predeterminada y se obtiene por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados, comprende menos restos aminoácidos que confieren hidrofobicidad de superficie. Esto implica menos problemas con baja solubilidad y agregación. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree actualmente que las características más hidrófilas actúan para desplazar la biodistribución
- 50

del polipéptido tras administración a un huésped, de una ruta hepatobiliar (excreción a través del hígado) a una ruta renal más deseada (excreción a través de los riñones).

- Un polipéptido, que se une a una diana predeterminada y se obtiene por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados, comprende menos restos aminoacídicos que se asocian con problemas de estabilidad polipeptídica, tales como metionina, asparagina y el dipéptido asparagina-prolina. La metionina es susceptible de oxidación, la asparagina es susceptible de desamidación y el enlace asparagina-prolina es susceptible de escisión ácida, y contribuyen por lo tanto a la no homogeneidad del producto final.
- Un polipéptido, que se une a una diana predeterminada y se obtiene por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados, carece de restos aminoacídicos que, en un contexto de secuencia similar, se ha descubierto que aumentan la interacción con inmunoglobulinas que contienen un dominio variable de cadena pesada de VH3 (Silverman GJ (1992) mencionado anteriormente). Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree actualmente que el reemplazo de tales restos aminoacídicos en un polipéptido, que se unen a una diana predeterminada y se obtienen por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, reduce la antigenicidad del polipéptido tras la administración del mismo a un huésped.

Entre las ventajas del armazón de la invención, la estabilidad alcalina, baja antigenicidad, estabilidad estructural, propiedades mejoradas para síntesis química y/o hidrofiliía mejorada están entre las más importantes.

Los polipéptidos, que se unen a una diana predeterminada y se obtienen por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados, pueden usarse como reactivos de detección, reactivos de captura, reactivos de separación, agentes de diagnóstico para diagnóstico *in vivo* o *in vitro*, como agentes terapéuticos por sí mismos o como medios para dirigir otros agentes terapéuticos y/o de diagnóstico a la diana predeterminada. Pueden realizarse procedimientos que emplean los polipéptidos de acuerdo con la invención *in vitro* en diferentes formatos, tales como en placas de microtitulación, en matrices de proteínas, en superficies de biosensores, en secciones tisulares y así sucesivamente.

Las modificaciones analizadas anteriormente para los polipéptidos que constituyen la población de acuerdo con la invención también son aplicables a los polipéptidos obtenidos por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden producirse por cualquier medio conocido, incluyendo síntesis química o expresión en diferentes huéspedes procariontes o eucariotes, incluyendo plantas y animales transgénicos.

La invención se ilustrará ahora en detalle a través de la descripción de experimentos realizados de acuerdo con la misma. Los ejemplos que siguen no deben interpretarse como limitantes. En los ejemplos, se hace referencia a las figuras adjuntas. La invención se limita exclusivamente como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra resultados obtenidos de mediciones de DC, usando un espectropolarímetro Jasco J-810. La medición de temperatura variable de His₆-ZTNF- α :3230 se realizó a 0,5 mg/ml en tampón de PBS. La absorbancia se midió a 221 nm de 20 a 80 °C, con una pendiente de temperatura de 5 °C/min. Se usó una celda con una longitud de camino óptico de 1 mm. La temperatura de fusión (T_m) de His₆-ZTNF- α :3230 se determinó a partir de la medición de la temperatura variable.

La Figura 2 muestra una visión de conjunto de la selección descrita en el Ejemplo 4. La selección se realizó en dos pistas diferentes, una con una alta concentración de diana (pista 1) y una con una baja concentración de diana (pista 2). Se proporcionan las concentraciones diana para cada pista y ciclo así como el número de lavados (entre paréntesis).

La Figura 3 es una representación de superposición de dos espectros de DC antes (línea completa) y después (línea discontinua) del calentamiento de His₆-Z04674 a 96 °C.

La Figura 4 muestra el resultado de un análisis de Biacore de variantes polipeptídicas; sensogramas obtenidos después de inyección secuencial de His₆-Z04777 (rectángulos llenos), His₆-Z04687 (triángulos llenos), His₆-Z04665 (triángulos abiertos), His₆-Z04674 (línea negra), His₆-Z04781 (línea gris) y tampón de ejecución (rectángulos abiertos) sobre Dynazyme inmovilizada. La respuesta (en UR) se representó frente al tiempo (s).

La Figura 5 muestra perfiles de elución de HPLC analítica para polipéptidos con la secuencia maESEKYAKEMRNAYWEIALLP NLTNQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK (SEC ID N°: 10) en la etapa de síntesis de los restos aminoacídicos 18 a 58. A) Síntesis realizada en resina de poliestireno usando pseudoprolinas en las posiciones 22-23, 41-42, 45-46 y 53-54. B) Síntesis de péptido convencional en resina de poliestireno sin pseudoprolinas.

La Figura 6 muestra perfiles de elución de HPLC analítica para polipéptidos con la secuencia maESEKYAKEMRNAYWEIALLP NLTNQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK (SEC ID N°: 10) en la etapa de síntesis de los restos aminoacídicos 1 a 58 (A) y 10 a 58 (B). A) Síntesis realizada en resina de poliestireno usando pseudoprolinas en las posiciones 22-23, 41-42, 45-46 y 53-54. B) Síntesis de péptido convencional en resina de poliestireno sin pseudoprolinas.

La Figura 7 muestra los perfiles de elución de HPLC analítica para polipéptidos con la secuencia A) AEAKYAKEMW IAWEEIRNLP NLNGWQMTAF IAKLLDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK (SEC ID N°:

11) (de acuerdo con la invención) y B) AENKFNKEMW IAWEEIRNLP NLTGWQMTAF IASLLDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK (SEC ID N°: 12) (para comparación).

Ejemplos

Ejemplo 1 – Construcción de una biblioteca de polipéptidos combinatoria

5 Se construyó una biblioteca combinatoria de polipéptidos esencialmente como se describe en Grönwall C y col (2007) J Biotechnol 128: 162-183, por amplificación por PCR de un oligonucleótido molde de 123 nucleótidos con ciertos codones degenerados (5'-GTA GAT GCC AAA TAC GCC AAA GAA NNN NNN NNN GCG NNN NNN GAG
10 ATC NNN NNN TTA CCT AAC TTA ACC NNN NNN CAA NNN NNN GCC TTC ATC NNN AAA TTA NNN GAT GAC CCA AGC CAG AGC-3' (SEC ID N°: 38)) que codifica las hélices 1 y 2 de la proteína Z derivada de proteína A de *Staphylococcus aureus* (Nilsson y col (1987), mencionado anteriormente), con las mutaciones puntuales N3A, F5Y, N6A, N23T y S33K. La amplificación por PCR se realizó usando los cebadores AFFI-1364 y AFFI-1365 con un sitio Xho I y un sitio Sac I, respectivamente, subrayados en la Tabla 1.

15 El fragmento génico resultante que codifica la biblioteca se restringió con Xho I y Sac I. Posteriormente, el fragmento génico que codifica la biblioteca se ligó en un vector fagémido restringido por Xho I y Sac I adoptado para presentación de fagos denominado pAY2016, esencialmente basado en el vector fagémido pAffi1 (Grönwall C y col (2007), mencionado anteriormente), en fase con los restos aminoacídicos 41-58 de la proteína Z, que codifican la hélice 3 con las mutaciones puntuales A42S, N43E, A46S y A54S. La hélice 3 se construyó hibridando los dos oligonucleótidos complementarios AFFI-1333 y AFFI-1334 (Tabla 1).

20 El vector de biblioteca resultante se introdujo por electroporación en *Escherichia coli* cepa RR1ΔM15 (Ruther U (1982) Nucl Acids Res 10: 5765-5772), produciendo una biblioteca de $2,4 \times 10^{10}$ miembros.

Se realizó preparación de repertorios de fagos de la biblioteca usando procedimientos convencionales que implicaban el fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, Beverly, MA, Estados Unidos), produciendo de forma rutinaria titulaciones de fagos de aproximadamente 10^{11} ufc por ml de cultivo.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'
AFFI-1333	AGCTCTGAATTACTGAGCGAAGCTAAAAAGCTAAATGATAGC CAGGCGCCGAAAGTAGACTAC (SEC ID N°: 34)
AFFI-1334	GTAGTCTACTTTTCGGCGCCTGGCTATCATTTAGCTTTTTCGCTCAGTAATTCAGAGCT (SEC ID N°: 35)
AFFI-1364	AAATAAATCTCGAGGTAGATGCCAAATACGCCAAAG (SEC ID N°: 36)
AFFI-1365	TAAATAATGAGCTCTGGCTTGGGTCATC (SEC ID N°: 37)

25

Ejemplo 2 – Selección de presentación de fagos y caracterización de variantes polipeptídicas de unión a HER2 humano

Sumario

30 Se usa proteína HER2 biotinilada como diana en selecciones de presentación de fagos usando la biblioteca construida en el Ejemplo 1. Se llevan a cabo selecciones usando una diversidad de condiciones para maximizar la probabilidad de obtener moléculas que tengan una alta afinidad por HER2. Después de la elución de los fagos seleccionados, las proteínas expresadas correspondientes se ensayan con respecto a afinidad por HER2 en una preparación de ELISA. Se identifican y secuencian clones positivos, y las secuencias de aminoácidos predichas de los polipéptidos correspondientes y sus motivos de unión a HER2 se deducen, lo que produce un gran número de
35 secuencias de moléculas de unión a HER2.

Biotinilación de HER2

40 Se disuelve proteína HER2 humana liofilizada (R&D Systems, N° 1129-ER) en PBS (KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,4) a una concentración final de 10 mg/ml. Se disuelve Sulfo-NHS-LC-Biotina EZ-link (Pierce, N° 21335) en agua a una concentración final de 1 mg/ml y se añade un exceso molar de 5 y 30 veces a 500 μg de HER2 en un volumen total de 0,5 ml. Las mezclas se incuban a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. La biotina no unida se retira por diálisis frente a PBS usando un casete de diálisis (Slide-A-Lyser, 10 kDa; Pierce).

Selección de presentación de fagos

En total, se llevan a cabo cinco ciclos de selección, usando condiciones crecientemente rigurosas, tales como concentración de HER2 decrecientes y números de lavados crecientes. Se realizan tres ciclos iniciales, principalmente con intención de establecer un protocolo de selección adecuado. Se lleva después a cabo selección durante dos ciclos más usando las combinaciones de tampón de selección, concentración diana y soporte sólido que se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de selección para selección de HER2

	Nombre de muestra	Complemento de tampón de selección	Concentración diana (nM)	Estreptavidina en perlas (µg)
Ciclo 4	A	Gelatina	20	100
	B	Gelatina	10	100
	C	BSA	5	100
	D	BSA	2,5	100
Ciclo 5	A	Gelatina	10	50
	B	Gelatina	5	50
	C	BSA	1	50
	D	BSA	0,5	50

10 Todos los tubos y perlas (Estreptavidina M-280 Dynabeads®, N° 112.06; Dynal) usados en el procedimiento de selección se prebloquean en TPBSB (5 %) (Tween 20 0,05 %, albúmina de suero bovino 5 % (BSA), azida sódica 0,02 % en PBS) o gelatina (0,5 %) durante al menos 30 minutos a TA.

15 Las soluciones de selección (1 ml) contenían HER2 humana biotinilada, fagos, azida sódica (0,02 %), Tween 20 (0,05 %) y BSA (3 %) o gelatina (0,1 %) de acuerdo con la Tabla 2, y se preparan en PBS. Los fagos se incuban con diana de HER2 humana biotinilada a 4 °C durante tres días para el Ciclo 4 y durante un día para el Ciclo 5, seguido de 1 hora de incubación en agitación a TA. Las muestras de selección se transfieren a perlas de estreptavidina bloqueadas durante 15 minutos en agitación a TA. Las perlas se lavan 10 veces con 1 ml de tampón de selección (es decir TPBSB (3 %) (Tween 20 0,05 %, albúmina de suero bovino 3 % (BSA), azida sódica 0,02 % en PBS) o GT 0,1 (gelatina 0,1 %, Tween 20 0,1 % y azida sódica 0,02 % en PBS)), seguido de 10 lavados con PBS en los que el penúltimo lavado se realiza durante 5 minutos. Los fagos se eluyen con 1000 µl de glicina-HCl 50 mM, pH 2,2, durante 10 minutos a TA, seguido de neutralización inmediata con 900 µl de PBS complementado con 100 µl de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, o se eluyen con 1000 µl de tripsina (2 mg/ml) durante 30 minutos a TA seguido de adición de 1000 µl de aprotinina (0,4 mg/ml). Los fagos eluidos (3/4 del volumen) se usan para infectar 50 ml de células *E. coli* RR1ΔM15 en fase logarítmica (Rüther, 1982, mencionado anteriormente) después de cada ciclo de selección. Después de 30 minutos de incubación con agitación suave y 30 minutos con agitación vigorosa a 37 °C, las células se centrifugan y el sedimento se disuelve en un volumen más pequeño y se extiende en placas TYE (agar 15 g/l, agua de triptona 10 g/l (Merck), extracto de levadura 5 g/l, NaCl 3 g/l complementado con glucosa 2 % y ampicilina 100 µg/ml) y finalmente se incuban durante una noche a 37 °C.

Preparación de repertorio de fagos

30 Se resuspenden células de las placas en medio TSB (caldo de cultivo de soja tréptico 30 g/l) y la concentración celular se determina midiendo la densidad óptica a 600 nm asumiendo que $DO_{600} = 1$ corresponde a 5×10^8 células/ml. Las células se inoculan (exceso de aproximadamente 100 veces de células en comparación con fagos eluidos) en 100 ml de medio TSB+YE complementado con glucosa 2 % y ampicilina 100 µg/ml y se cultivan a 37 °C a aproximadamente $DO_{600} = 0,5-0,7$. A continuación, se transfieren 10 ml a un nuevo matraz y se infectan por exceso molar 10 veces de fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, N° NO315S) y se incuban durante 30 minutos con agitación baja. Las células se sedimentan a 2000 g durante 10 minutos y se resuspenden en 100 ml de medio TSB+YE complementado con isopropilo β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 100 µM, kanamicina 50 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml y se dejan crecer durante una noche a 100 rpm y 25 °C. Una parte de las células resuspendidas se almacena a -80 °C como una reserva de glicerol.

40 El cultivo de una noche se centrifuga a 2500 g durante 10 minutos y los fagos en el sobrenadante se precipitan añadiendo 1/4 del volumen de tampón de precipitación (PEG 20 %/NaCl 2,5 M) y se incuban en hielo durante 1 hora. Los fagos precipitados se sedimentan por centrifugación a 10000 g a 4 °C durante 30 minutos, se resuspenden en

20 ml de PBS y a continuación se repite el procedimiento de precipitación. Los fagos se resuspenden finalmente en 1 ml de PBS y se filtran a través de un filtro de 0,45 µm.

5 Las soluciones de selección, lavado y elución se valoran después de cada ciclo de selección. Las soluciones de fago se diluyen en agua estéril en una placa de microtitulación y se añaden 100 µl de células *E. coli* RR1ΔM15 en fase logarítmica a cada dilución de fago. Después de 20 minutos de incubación a TA, se transfieren 5 µl de cada titulación a una placa de TYE y se incuban durante una noche a 37 °C. Las colonias resultantes se cuentan y las titulaciones (ufc/ml) se calculan.

Análisis de ELISA de unión de HER2

10 Los clones de los ciclos de selección finales se expresan y exploran con respecto a actividad de unión con HER2 usando una preparación de ELISA como se describe en el Ejemplo 4 posterior (pero usando HER2 como proteína diana), o como se describe posteriormente. Se expresan colonias seleccionadas de forma aleatoria en placas de 96 pocillos profundos inoculando cada colonia en 1 ml de medio TSB+YE complementado con ampicilina 100 µg/ml e IPTG 1 mM y se dejan crecer durante 18-24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se realizan placas repetidas transfiriendo una fracción pequeña de cada cultivo a placas de 96 pocillos con glicerol 15 % para almacenamiento a 15 -20 °C.

Las células restantes se sedimentan por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos, se resuspenden en 400 µl de PBS-T 0,05 (PBS complementado con Tween 20 0,05 %) y se congelan a -80 °C. Las muestras congeladas se descongelan en un baño de agua y las células se sedimentan a 3700 g durante al menos 20 minutos. Los sobrenadantes que contienen moléculas expresadas se recogen y se usan en ELISA.

20 Se revisten placas de microtitulación de media área (Costar, N° 3690) durante una noche a 4 °C con 50 µl de HSA a una concentración de 6 µg/ml en tampón de revestimiento de ELISA (Sigma, N° 3041). Los pocillos se bloquean con 100 µl de tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada 2 % en PBS) durante 2 horas a TA. Después de retirar el tampón de bloqueo, se añaden 50 µl de las proteínas preparadas a los pocillos y las placas se incuban durante 1,5 horas a TA. Los sobrenadantes se descartan y se añade HER2 biotinilado a una concentración de 0,5-10 µg/ml en PBS-T 0,05 a los pocillos y se incuba durante 1,5 horas. Los complejos unidos se detectan con peroxidasa de rábano rusticano, estreptavidina conjugada (HRP, Dako, N° P0397) diluida 1:5000 en PBS-T 0,05, y se incuba durante 1 hora a TA. Se añaden 50 µl de sustrato de TMB ImmunoPure® (Pierce, N° 34021) a los pocillos y las placas se tratan de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La absorbancia de los pocillos se lee a 450 nm en un lector de ELISA Tecan Ultra 384 (Tecan) y se evalúa usando software Magellan v. 5.0 (Tecan). Antes de la 30 adición de cada nuevo reactivo, se realizan cuatro lavados con PBS-T 0,05.

Basándose en los resultados de este experimento, se seleccionan clones para secuenciación como se describe a continuación.

Secuenciación de clones positivos de ELISA

35 Se amplifican fragmentos de PCR de colonias seleccionadas usando oligonucleótidos apropiados. La secuenciación de fragmentos amplificados se realiza usando un Kit de Secuenciación de Ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y con el oligonucleótido biotinilado apropiado. Las reacciones de secuenciación se purifican por unión con perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina Dynabeads® REGEN™ usando un instrumento Magnatrix 8000 (Magnetic Biosolutions) y finalmente se analizan en Analizador Genético ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems).

Subclonación en plásmido pAY1448

40 Se subclona ADN que codifica moléculas específicas de HER2 y seleccionadas en el vector de expresión pAY1448 para crear moléculas monoméricas marcadas con His₆ expresadas como MGSSHHHHHHLQ-[Z#####]-VD (His₆-Z#####), en la que Z##### indica un miembro identificado de la población de partida de moléculas variantes. Los plásmidos que contienen insertos se purifican a partir de 2 ml de cultivo de una noche de células *E. coli* RR1ΔM15 45 en TSB complementado con ampicilina 100 µg/ml usando Kit Qiagen Mini (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Se subclona ADN de las moléculas seleccionadas en el vector de expresión pAY1448 por clonación de extremos adhesivos de PCR Accl-NotI usando los pares de cebadores de PCR apropiados.

50 El vector de expresión pAY1448 se digiere en dos etapas a 37 °C durante 4 horas usando Accl y NotI en tampón NEB4 y NEB3 (New England Biolabs), respectivamente, y se desfosforilan con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP; Fermentas) durante 1 hora a 37 °C. El plásmido escindido y los fragmentos se purifican por kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los productos de PCR se hibridan y se ligan en pAY1448 desfosforilado y digerido con Accl-NotI durante 1 hora a TA usando ADN ligasa T4 (5 unidades/µl; Fermentas). Se introducen por electroporación alícuotas de las ligaciones

en células *E. coli* BL21 (DE3). Las células se siembran en placas con base de agar sangre de triptosa (TBAB) complementadas con kanamicina 50 µg/ml y se incuban durante una noche a 37 °C. Los clones positivos se verifican en primer lugar con respecto a insertos con exploración de PCR y después se analizan con respecto a secuencias correctas como se ha descrito anteriormente.

5 *Expresión y purificación de polipéptidos marcados con His₆*

Se expresan moléculas seleccionadas, todas subclonadas en pAY1448 como se ha descrito anteriormente, en *E. coli* BL21 (DE3) como fusiones con un marcador de His₆ N terminal y se purifican por IMAC. Se usa una colonia de cada molécula para inocular 5 ml de medio TSB complementado con kanamicina 50 µg/ml. Los cultivos se dejan crecer durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, se inoculan 50 µl de cada cultivo por separado a 100 ml de medio TSB+YE complementado con kanamicina 50 µg/ml en un matraz de 1 litro. Los cultivos se dejan crecer a 100 rpm a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,7-1, después de lo cual se añade IPTG a una concentración final de 0,5 mM y las células se incuban a TA durante una noche a 100 rpm. Los cultivos se recogen por centrifugación a 8000 g durante 5 minutos y los sedimentos se almacenan en un congelador hasta la preparación de proteínas.

Las proteínas marcadas con His₆ se purifican por IMAC en condiciones desnaturalizadas usando columnas de Ni-NTA Superflow de 1,5 ml (Qiagen). El tampón se intercambia a PBS usando columnas PD-10 (GE Healthcare).

La concentración proteica se determina usando A₂₈₀ y el Kit de Reactivo de Ensayo Proteico BCA (Pierce) como se recomienda por el fabricante. La pureza de las proteínas se analiza por SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie R.

Análisis de biosensor de la afinidad de moléculas seleccionadas por HER2 humano

Se realiza un análisis de biosensor en un instrumento Biacore2000 (GE Healthcare) con HER2 humano inmovilizado por acoplamiento de amina en la capa de dextrano carboxilado en la superficie de una microplaca CM-5 (de uso en investigación; GE Healthcare) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La superficie 1 en la microplaca se activa y desactiva y se usa como celda de referencia durante las inyecciones. Las moléculas seleccionadas, expresadas y purificadas como se ha descrito anteriormente, se diluyen en HBS-EP (GE Healthcare) a 25 nM y se inyectan a un caudal constante de 25 µl/min durante 10 minutos, seguido de disociación en HBS-EP durante 30 minutos. Las superficies se regeneran con dos inyecciones de HCl 25 mM.

Ejemplo 3 – Clonación, producción y evaluación de temperatura de fusión y antigenicidad *in vitro* de variantes de armazón originales y de la invención

Sumario

El presente ejemplo describe la clonación, producción y evaluación de variantes de armazón originales y de la invención. Se cree que las mutaciones de armazón introducidas mejoran varias propiedades de las moléculas polipeptídicas, tales como antigenicidad, hidrofilia y estabilidad alcalina y estructural. Por lo tanto, se evaluaron diferentes moléculas con respecto a temperatura de fusión y antigenicidad *in vitro* y los resultados mostraron que las moléculas de la invención tenían temperaturas de fusión aumentadas y presentaron antigenicidades *in vitro* más bajas (menor unión con IgG) en comparación con las moléculas originales.

Clonación de polipéptidos

Para las construcciones originales, se amplificaron secuencias de ADN que codificaban moléculas específicas para Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α), HER2, insulina, Taq polimerasa y Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas beta (PDGF-Rβ) (Tabla 3) por PCR en dos reacciones individuales cada una (PCR1 y PCR2). Se aplicaron los pares de cebadores AFFI-267/AFFI-1014 y AFFI-1015/AF-FI-270 (Tabla 4), que codificaban partes del sitio de restricción AclI en los extremos 5' en PCR1 y PCR2, respectivamente. Para preparar los moldes de plásmidos, las bacterias que albergaban el ADN plasmídico se cultivaron durante una noche en medio TSB, complementado con kanamicina 50 µg/ml. Las células se sedimentaron por centrifugación y los plásmidos se prepararon usando Kit de Miniprep Spin QIAprep (Qiagen).

Para construcciones de la invención, se realizó amplificación por PCR (PCR1 y PCR2) de secuencias de nucleótidos que codifican moléculas modificadas de la invención usando oligonucleótidos parcialmente solapantes como moldes (AFFI-1320-AFFI-1323, AFFI-1326 y AFFI-1327) o usando vector con construcción original y oligonucleótidos que contienen mutaciones relevantes (AFFI-69, AFFI-70, AFFI-1151 y AFFI-1152) (Tabla 4). Los pares de cebadores AFFI-1328/AFFI-1331 y AFFI-1329/AFFI-1330, que codifican partes del sitio de restricción AclI en los extremos 5', se incluyeron en las reacciones de PCR.

Las reacciones de PCR se amplificaron usando ADN polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, N° 600854-52) de acuerdo con un protocolo de PCR convencional y los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1 %.

Las variantes Z de unión a PDGF-R β se generaron usando oligonucleótidos con diversos codones y una técnica de mutagénesis basada en PCR. Los fragmentos de PCR obtenidos se ligaron en un vector de expresión escindido usando tecnología In-Fusion (Clontech, N° 639607).

5 Para generar fragmentos de ADN que contenían extremos adhesivos Accl cadena arriba y cadena abajo para todas las construcciones, se separaron cadenas de nucleótidos directas e inversas de los productos de PCR1 y PCR2 usando perlas de estreptavidina magnéticas. Después de 30 minutos de incubación a TA en rotación continua, las perlas se lavaron con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM) y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. El sobrenadante que contenía los fragmentos no biotinilados se recogió y se calentó a 95 °C, seguido de enfriamiento por etapas a 25 °C durante 30 minutos para hibridar las cadenas de ADN.

10 Los fragmentos de ADN que codificaban moléculas de unión se ligaron posteriormente a TA, durante 2 horas o durante una noche, en un vector de expresión tratado con CIP (fosfatasa alcalina intestinal de ternero) y purificado, previamente digerido con enzima de restricción Accl. Las construcciones conseguidas fueron MGSSHHHHHLLQ-[Z#####]-VD, MGSSLQ-[Z#####]-VDC (para Z_{PDGF-R β :2465}) o M-[Z#####]-C (para Z_{PDGF-R β :3358}).

15 Las ligaciones se transformaron en células *E. coli* TOP10 electrocompetentes y se cultivaron en placas como se describe en el Ejemplo 2. Las colonias bacterianas que albergaban los plásmidos recién construidos se exploraron por PCR y las secuencias de ADN insertas se verificaron como se describe en el Ejemplo 2.

Se prepararon plásmidos verificados como se ha descrito anteriormente.

Expresión de polipéptidos

20 Se inocularon cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con plásmidos relevantes en 800 ml de medio TSB-YE complementado con kanamicina 50 μ g/ml y agente antiespumante 0,3 ml/l (Breox FMT 30) y se dejaron crecer a 37 °C a una DO600 de aproximadamente 2. Se indujo después expresión proteica mediante adición de IPTG 1 M a una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos se realizaron usando el sistema multifementador Greta (Belach). Los cultivos se recogieron 5 horas después de inducción por centrifugación a 15900 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos celulares se recogieron y se almacenaron a -20 °C. El nivel de expresión proteica se determinó usando SDS-PAGE e inspección ocular de los geles teñidos.

Purificación de polipéptidos expresados

30 Se purificaron proteínas con marcador His₆ como sigue: Se suspendieron células bacterianas sedimentadas que albergaban polipéptidos marcados con His₆ solubles en tampón de unión His GraviTrap (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM y Benzonase® 40 U/ml) y se rompieron por ultrasonificación. Después de clarificación, los sobrenadantes se cargaron en columnas His GraviTrap (GE Healthcare) previamente equilibradas con tampón de unión His GraviTrap. Después de lavar las columnas con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de lavado His GraviTrap (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 60 mM), los polipéptidos se eluyeron con 3 VC de tampón de elución His GraviTrap (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM).

35 Las proteínas sin marcador His₆ se purificaron como sigue: Se suspendieron células bacterianas sedimentadas que albergaban Z_{PDGF-R β :2465}-Cys o Z_{PDGF-R β :3358}-Cys en Tris-HCl 20 mM, pH 7,1. Para romper las células y liberar el contenido intracelular, las suspensiones celulares se calentaron a 85 °C durante 3 minutos. Los lisados se clarificaron por centrifugación seguido de filtración y se cargaron en 25 ml de Q Sepharose FF (GE Healthcare) empaquetados en una columna XK26 (GE Healthcare), previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 7,1. Después de lavar la columna con 5 VC de Tris-HCl 20 mM, pH 7,1, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7,1, durante 10 VC. El caudal fue de 5 ml/min y se controló la señal de 280 nm. Las fracciones que contenían Z_{PDGF-R β :2465}-Cys o Z_{PDGF-R β :3358}-Cys se identificaron por análisis de SDS-PAGE. Las fracciones relevantes se agruparon y el pH se ajustó a 8,0 por adición de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, a una concentración final de 50 mM. La cisteína C terminal en las construcciones se redujo por adición de DTT a 20 mM, seguido de incubación a 40 °C durante 3 minutos. Después de reducción, se añadió acetonitrilo (ACN) a una concentración final de 5 % y se cargó Z_{PDGF-R β :2465}-Cys o Z_{PDGF-R β :3358}-Cys reducido en 1 ml de columnas Resource 15 RPC (GE Healthcare), previamente equilibradas con tampón RPC A (TFA 0,1 %, ACN 5 %, agua 95 %). Después de lavado de columna con 10 VC de tampón RPC A, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de Tampón RPC B 0-40 % (TFA 0,1 %, ACN 80 %, agua 20 %). El caudal fue de 1 ml/min y se controló la señal de 280 nm. Las fracciones que contenían Z_{PDGF-R β :2465}-Cys o Z_{PDGF-R β :3358}-Cys puro se identificaron por análisis de SDS-PAGE y se agruparon.

55 Para permitir la liofilización de las proteínas, el tampón se intercambió a tampón de carbonato de hidrógeno de amonio 10 mM, pH 8,0 o tampón de acetato de amonio 10 mM, pH 6,0, usando columnas de desalación de PD-10 desechables (GE Healthcare). El tampón de liofilización se seleccionó con respecto al punto isoeléctrico de proteínas relevantes. Finalmente, los polipéptidos de unión His₆-Z_{TNF- α :185}, His₆-Z_{HER2:342}, His₆-Z_{Insulina:810}, His₆-Z_{Taq:1154}, Z_{PDGF-R β :2465}-Cys, His₆-Z_{HER2:2628}, His₆-Z_{Taq:3229}, His₆-Z_{TNF- α :3230}, His₆-Z_{Insulina:3232} y Z_{PDGF-R β :3358}-Cys se liofilizaron usando un instrumento Christ Alfa 2-4 LSC y se almacenaron a 4 °C hasta su uso (Tabla 5). La cisteína C terminal libre se bloqueó usando N-etilmaleimida (NEM) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante

(Pierce).

Análisis de polipéptidos purificados

Se realizó determinación de la concentración de soluciones polipeptídicas midiendo la absorbancia a 280 nm usando un Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Las proteínas se analizaron adicionalmente con SDS-PAGE y CL-EM.

- 5 Para el análisis de SDS-PAGE, se mezclaron aproximadamente 10 µg de polipéptido con Tampón de Muestra LDS y DTT (concentración final 45 mM), se incubó a 70 °C durante 15 minutos y se cargó en Geles Bis-Tris 4-12 % NuPAGE®. Los geles se procesaron con Tampón de Ejecución MES SDS en una Mini Celda Novex empleando el patrón preteñido SeeBlue® Plus2 como marcador de peso molecular y Solución de Tinción de Proteínas PageBlue™ para tinción.
- 10 Para verificar la identidad de los polipéptidos, se analizaron análisis de CL/EM usando un sistema Agilent 1100 LC/MSD, equipado con API-ESI y un analizador de masas cuádruple sencillo. Después de intercambio de tampones, las muestras proteicas se diluyeron en tampón de liofilización a una concentración final de 0,5 mg/ml y se cargaron 10 µl en una columna Zorbax 300SB-C8 Narrow-Bore (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) a un caudal de 0,5 ml/min. Las proteínas se eluyeron usando un gradiente lineal de solución B 10-70 % durante 30 minutos a 0,5 ml/min. La separación se realizó a 30 °C. Se controló la señal iónica y la absorbancia a 280 y 220 nm. Los pesos moleculares de las proteínas purificadas se determinaron por análisis de la señal iónica.
- 15

Determinación de la temperatura de fusión (T_m)

- 20 Se disolvieron polipéptidos liofilizados en PBS a una concentración final de aproximadamente 0,5 mg/ml y se almacenaron en hielo. Se realizó análisis de DC en un espectropolarímetro Jasco J-81 0 en una celda con una longitud del camino óptico de 1 mm. En mediciones de temperatura variable, la observancia se midió a 221 nm de 20 a 80 °C, con una pendiente de temperatura de 5 °C/min. Se calcularon las temperaturas de fusión (T_m) para los polipéptidos ensayados determinando el punto medio de la transición en la representación de DC frente a temperatura.

- 25 Las moléculas polipeptídicas modificadas de acuerdo con la invención tuvieron temperaturas de fusión crecientes en comparación con las moléculas originales (Tabla 6). En la Figura 1, se muestra la curva de fusión obtenida para His₆-Z_{TNF-α:3230} (polipéptido específico de TNF-α de la invención).

ELISA de antigenicidad in vitro (análisis de unión de IgG en suero)

- 30 Las condiciones generales para el ELISA fueron como sigue: se realizaron los ensayos de ELISA en placas de 96 pocillos de media área. Los volúmenes usados fueron 50 µl por pocillo para todas las incubaciones excepto para el bloqueo en el que se usaron 100 µl. Se realizó revestimiento durante una noche a 4 °C en tampón de revestimiento (Na₂CO₃ 15 mM y NaHCO₃ 35 mM) y todas las otras incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Se realizó dilución de suero de primate y anticuerpos de detección en PBS + caseína 0,5 %. Todos los lavados se realizaron usando un Scan Washer 300 de ELISA automático, en el que cada pocillo se lavó cuatro veces con 175 µl de tampón de lavado (PBS-T; Tween 20 0,05 % en 1 x PBS) por lavado.

- 35 Los pocillos de la placa de ELISA se revistieron con 2 µg/ml de los polipéptidos de unión His₆-Z_{TNF-α:185}, His₆-Z_{HER2:342}, His₆-Z_{Insulina:810}, His₆-Z_{Taq:1154}, Z_{PDGF-Rβ:2465}-Cys, His₆-Z_{HER2:2628}, His₆-Z_{Taq:3229}, His₆-Z_{TNF-α:3230}, His₆-Z_{Insulina:3232} y Z_{PDGF-Rβ:3358}-Cys-NEM. Z_{HER2:342} se usó como patrón. Después del revestimiento, los pocillos se lavaron dos veces con agua del grifo y se bloquearon con PBS + caseína 0,5 %. La placa se vació y se añadió una serie de diluciones 2 veces de un grupo de suero de primate de mono cinomolgus (*Macaca fascicularis*; obtenida del Instituto Sueco para el Control de Enfermedades Infecciosas) a los pocillos. La serie de valoraciones comenzó con una dilución 1/100 y terminó a 1/102400. La dilución se realizó directamente en la placa de 96 pocillos. Después de incubar durante 1 hora con el grupo de suero de primate, la placa se lavó y se añadió un anticuerpo anti-Ig humano-HRP de cabra en dilución 1/5000 para detección. Después de 50 minutos de incubación con el anticuerpo de detección, la placa se lavó y se añadió el sustrato. Se mezclaron volúmenes iguales de los dos componentes en el kit de TMB ImmunoPure®, y se añadieron 50 µl por pocillo. Posteriormente, la placa se incubó en oscuridad durante 12 minutos y la reacción se detuvo por adición de 50 µl de solución de parada (H₂SO₄ 2 M). La absorbancia a 450 nm se registró usando un lector de ELISA. Como control negativo, se usó PBS + caseína 0,5 % en lugar del grupo de suero de primate.
- 40
- 45

- 50 Para evaluar los resultados y obtener un valor de IVA que represente el nivel de moléculas de Ig de primate que se unen al polipéptido, se usó el programa GraphPad Prism 5. Se añadieron valores de muestra, con los valores de DO de fondo restados, a un molde basado en una fórmula de regresión no lineal XY (respuesta de dosis sigmoidea). Se obtuvo un valor de dilución para DO 0,3 a partir de la fórmula y los valores de IVA se calcularon estableciendo el valor de dilución convencional en 100 y relacionando todas las muestras con 100. Un valor por debajo de 100 indica una capacidad reducida del polipéptido ensayado para unirse con inmunoglobulinas en comparación con la molécula Z_{HER2:342} usada como un control positivo.
- 55

Las moléculas de la invención mostraron menos potencial para unirse a inmunoglobulinas en comparación con moléculas originales (Tabla 7). Los resultados se muestran como valores de antigenicidad *in vitro* (IVA), y una antigenicidad *in vitro* reducida (unión de IgG) se lee como una reducción del valor de IVA.

Tabla 3. Lista de secuencias polipeptídicas de unión

Nombre	Secuencia de aminoácidos
Z _{TNF-α:185}	VDNKFNKELGWAIGEIGTLPNLNHQQFRAFILSLWDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (SEC ID N°: 5)
Z _{HER2:342}	VDNKFNKEMRNAYWEIALLPNLNNQQKRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (SEC ID N°: 6)
Z _{Insulina:810}	VDNKFNKEKYMAYGEIRLLPNLNHQQVMAFIDSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (SEC ID N°: 7)
Z _{Taq:1154}	VDNKFNKEKGEAWEIFRLPNLNGRQVKAFIASLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (SEC ID N°: 8)
Z _{PDGF-Rβ:2465}	VDNKFNKELIEAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (SEC ID N°: 9)

5

Tabla 4. Lista de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'
AFFI-069	GTGAGCGGATAACAATTCCCCTC (SEC ID N°: 13)
AFFI-070	CAGCAAAAACCCCTCAAGACCC (SEC ID N°: 14)
AFFI-115	CAGCAAAAACCCCTCAAGACCC (SEC ID N°: 15)
AFFI-267	AGATAACAAATTCAACAAAG (SEC ID N°: 16)
AFFI-270	CTACTTTTCGGCGCCTGAGCATCATTTAG (SEC ID N°: 17)
AFFI-1014	ACTTTTCGGCGCCTGAGCATCATTTAG (SEC ID N°: 18)
AFFI-1015	ATAACAAATTCAACAAAGAA (SEC ID N°: 19)
AFFI-1043	ACTTTTCGGCGCCTGAGAATCATTTAGCTTTTTA (SEC ID N°: 20)
AFFI-1044	CTACTTTTCGGCGCCTGAGAATCATTTAGCTTTTTA (SEC ID N°: 21)
AFFI-1143	AGATGCCAAATACGCCAAAGAAATGCGAA (SEC ID N°: 22)
AFFI-1144	ATGCCAAATACGCCAAAGAAATGCGAA (SEC ID N°: 23)
AFFI-1151	CCCAAGCCAAAGCTCTGAATTGCTATCAGAAGCTAAAAGC (SEC ID N°: 24)
AFFI-1152	GCTTTTTAGCTTCTGATAGCAATTCAGAGCTTTGGCTTGGG (SEC ID N°: 25)
AFFI-1320	AGATGCCAAATACGCCAAAGAAAAGGGGGAGGCGGTGGTT GAGATCTTTAGGTTACCTAACCCTAACCCTGAGGCAAGTGAA GGCCTTCATCGCGAAATTATA (SEC ID N°: 26)
AFFI-1323	CTACTTTTCGGCGCCTGGCTATCATTTAGCTTTTTAGCTTCGCTCAGTAATTCAGAGCTC TGGCTTGGGTCATCCATAATTTAAGGATGAAGGCCCGAAATT (SEC ID N°: 27)
AFFI-1326	AGATGCCAAATACGCCAAAGAAAAGTATATGGCGTATGGTGAGATCCGTTGTTACCT AACTTAACCCATCAGCAAGTTATG GCCTTCATCGATAAATTAGT (SEC ID N°: 28)
AFFI-1327	CTACTTTTCGGCGCCTGGCTATCATTTAGCTTTTTAGCTTCGCTCAGTAATTCAGAGCTC TGGCTTGGGTCATCCACTAATTT ATCGATGAAGGCCATAACTT (SEC ID N°: 29)

(continuación)

Nombre	Secuencia 5'-3'
AFFI-1328	AGATGCCAAATACGCCAAAG (SEC ID N°: 30)
AFFI-1329	ATGCCAAATACGCCAAAGAA (SEC ID N°: 31)
AFFI-1330	CTACTTTCGGCGCCTGGCTATCATTTAG (SEC ID N°: 32)
AFFI-1331	ACTTTCGGCGCCTGGCTATCATTTAG (SEC ID N°: 33)

Tabla 5. Lista de polipéptidos ensayados

Diana	Designación	Variante
TNF-alfa	His ₆ -Z _{TNF-α} :185	Original
TNF-alfa	His ₆ -Z _{TNF-α} :3230	Inventión
HER2	Z _{HER2} :342	Original
HER2	His ₆ -Z _{HER2} :342	Original
HER2	His ₆ -Z _{HER2} :2628	Inventión
Insulina	His ₆ -Z _{Insulina} :810	Original
Insulina	His ₆ -Z _{Insulina} :3232	Inventión
Taq polimerasa	His ₆ -Z _{Taq} :1154	Original
Taq polimerasa	His ₆ -Z _{Taq} :3229	Inventión
PDGF-Rβ	Z _{PDGF Rβ} :2465-Cys	Original
PDGF-Rβ	Z _{PDGF Rβ} :3558-Cys	Inventión

5

Tabla 6. Valores de Tm determinados de los polipéptidos ensayados

Diana	Designación	Variante	Tm (°C)
TNF-alfa	His ₆ -Z _{TNF-α} :185	Original	53
TNF-alfa	His ₆ -Z _{TNF-α} :3230	Inventión	60
HER2	His ₆ -Z _{HER2} :342	Original	63
HER2	His ₆ -Z _{HER2} :2628	Inventión	69
Insulina	His ₆ -Z _{Insulina} :810	Original	42
Insulina	His ₆ -Z _{Insulina} :3232	Inventión	48
Taq polimerasa	His ₆ -Z _{Taq} :1154	Original	46
Taq polimerasa	His ₆ -Z _{Taq} :3229	Inventión	50
PDGF-Rβ	Z _{PDGF Rβ} :2465-Cys-NEM	Original	42
PDGF-Rβ	Z _{PDGF Rβ} :3558-Cys-NEM	Inventión	42

Tabla 7. Valores de IVA de los polipéptidos ensayados

Diana	Designación	Variante	Valor de IVA
TNF-alfa	His ₆ -Z _{TNF-α} :185	Original	38
TNF-alfa	His ₆ -Z _{TNF-α} :3230	Invencción	21
HER2	His ₆ -Z _{HER2} :342	Original	99
HER2	His ₆ -Z _{HER2} :2628	Invencción	14
Insulina	His ₆ -Z _{Insulina} :810	Original	43
Insulina	His ₆ -Z _{Insulina} :3232	Invencción	16
Taq polimerasa	His ₆ -Z _{Taq} :1154	Original	26
Taq polimerasa	His ₆ -Z _{Taq} :3229	Invencción	18
PDGF-Rβ	Z _{PDGF-Rβ} :2465-Cys-NEM	Original	35
PDGF-Rβ	Z _{PDGF-Rβ} :3558-Cys-NEM	Invencción	3

Ejemplo 4 – Selección y caracterización de presentación de fagos de variantes polipeptídicas de unión a Dynazyme

5 Biotinilación de Dynazyme

La ADN polimerasa de la proteína diana Dynazyme II (Dynazyme) de la especie *Thermus brockianus* (Finnzymes, N° F-501 L) se biotiniló usando un exceso molar 10 x de Sulfo-NHS-LC-biotina No-weight™ (Pierce, N° 21327) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El tampón se cambió por diálisis usando casete de diálisis Slide-a-lyzer (Pierce, 10K, 0,5-3 ml) a PBS antes de biotinilación y a TKMT (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 0,1 %, pH 8,8) después de biotinilación para retirar la biotina no unida.

Selección de presentación de fagos

Se realizó selección frente a Dynazyme biotinilada usando la población de polipéptidos de la invención (Ejemplo 1). Se utilizaron dos enfoques para selección; uno con una concentración de diana alta (pista 1) y uno con una baja concentración de diana (pista 2). Se realizaron cuatro ciclos de selección. Se prepararon nuevos repertorios de fagos entre cada ciclo. Para visión de conjunto y detalles de la selección, véase Figura 2.

El repertorio de biblioteca de fagos se precipitó con PEG/NaCl dos veces como se describe en el Ejemplo 2 y se disolvió en TKMT complementado con gelatina 0,1 % (TKMTg). Los fagos se preincubaron con perlas revestidas con estreptavidina (perlas SA, Dynabeads® M-280) durante 30 minutos a TA. Las perlas usadas en el procedimiento de selección y todos los tubos se prebloquearon en TKMTg.

Las concentraciones diana y el número de lavados en cada ciclo se presentan en la Figura 2. El tampón usado para selección y lavados fue TKMTg. Los fagos preseleccionados se incubaron con la diana biotinilada durante 17 horas a 4 °C seguido de 3 horas a TA durante el primer ciclo y 3 horas o 1 hora, respectivamente, durante los siguientes ciclos. Posteriormente, las partículas de fagos se transfirieron a perlas SA prebloqueadas, 5 mg (pista del primer ciclo 1), 3,5 mg (pista del primer ciclo 2) o 0,5 mg (todos los otros ciclos) y se incubaron durante 10 minutos con agitación. A continuación, las perlas se lavaron y las partículas de fagos se eluyeron con un tampón de pH bajo como se describe en el Ejemplo 2. Los fagos eluidos se usaron para infectar células *E. coli* RR1ΔM15 en fase logarítmica después de cada ciclo de selección. Después de 20 minutos de incubación a 37 °C, las células se recogieron por centrifugación. El sedimento se disolvió en un volumen pequeño de TBS-YE, se extendieron en placas TYE y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se prepararon repertorios de fagos entre cada ciclo esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Las titulaciones de partículas de fago y rendimientos se calcularon después de cada ciclo de selección. El rendimiento de partículas de fago (partículas de fago fuera/partículas de fago dentro) aumentó para cada ciclo (excepto el segundo), lo que indica un enriquecimiento de los clones de unión a diana.

Análisis de ELISA de polipéptidos de unión a Dynazyme

Se seleccionaron aleatoriamente clones obtenidos después del último ciclo de selección y se usaron para expresión de proteína periplásmica en un formato de placa de 96 pocillos como se describe en el Ejemplo 2. Se ensayaron sobrenadantes que contenían variantes polipeptídicas solubles fusionadas con ABD con respecto a unión con diana

en un ELISA como sigue. Los polipéptidos de unión potencial se expresaron como AQLE-[Z#####]-VDYV-[ABD]-SQKA (ABD = el dominio de unión a albúmina GA3 de *Streptococcus* sp. G148, Kraulis y col (1996) FEBS Lett. 378(2): 190-194), en la que Z##### indica variantes individuales de la población de polipéptidos de la invención.

5 Se revistieron pocillos de microtitulación de media área (Costar, N° 3690) con 50 μ l de Dynazyme 2-3 μ l/ml en tampón de revestimiento de ELISA. Los pocillos se bloquearon con 100 μ l de TKMT complementado con caseína 0,5 % (Sigma) (TKMT-caseína) durante 1 hora a TA. Después de la retirada de la solución de bloqueo, se añadieron 50 μ l de sobrenadantes a los pocillos y las placas se incubaron durante 1,5 horas a TA. Se detectaron variantes polipeptídicas capturadas añadiendo un anticuerpo primario y después uno secundario. El anticuerpo primario, una Ig de conejo policlonal purificada por afinidad frente a variantes Z, se diluyó 1:5000 en TKMT-caseína y se incubó durante 1,5 horas a TA. El anticuerpo secundario, una Ig α -conejo-HRP de cabra (DakoCytomation, N° P0448), se diluyó 1:5000 en TKMT-caseína y se incubó durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron cuatro veces con TKMT antes de la incubación con los anticuerpos y la solución de revelado.

15 Las placas se revelaron como se describe en el Ejemplo 2 y se leyeron a 450 nm en un espectrofotómetro de ELISA. Todas las placas se prepararon con controles negativos y positivos relevantes así como con un blanco en el que se usó TKMT en lugar de sobrenadante periplásmico. En total, se exploraron 1080 clones seleccionados de forma aleatoria en ELISA con respecto a su unión con Dynazyme. Se seleccionaron clones positivos y algunos clones con bajos valores de absorbancia para la secuenciación.

Secuenciación de polipéptidos positivos para ELISA

20 Se sometieron clones individuales a secuenciación de acuerdo con el Ejemplo 2. Se encontraron once polipéptidos de unión únicos considerados positivos en exploración por ELISA. Algunos de los clones aparecieron en varias copias. Además, se identificaron varias secuencias de clones con valores de ELISA más bajos.

Subclonación de polipéptidos en plásmido pA Y1448

25 Se sometieron quince polipéptidos únicos a subclonación como monómeros en el vector de expresión pAY1448 proporcionando un marcador His₆ N terminal (como se ha descrito en el Ejemplo 2) usando plásmidos preparados como moldes para la PCR de extremos adhesivos. La subclonación se realizó como se describe en el Ejemplo 3.

Purificación de polipéptidos

30 El siguiente texto describe la purificación de quince polipéptidos marcados con His₆ monoméricos, concretamente His₆-Z04665, His₆-Z04672, His₆-Z04674, His₆-Z04678, His₆-Z04687, His₆-Z04767, His₆-Z04770, His₆-Z04775, His₆-Z04776, His₆-Z04777, His₆-Z04778, His₆-Z04779, His₆-Z04780, His₆-Z04781 e His₆-Z04899. Se suspendieron células bacterianas sedimentadas que albergaban las moléculas marcadas con His₆ solubles en tampón de unión His GraviTrap™ (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM y Benzonase® 25 U/ml) y se rompieron por ultrasonificación. Las suspensiones de células sonicadas se calentaron usando agua caliente (95 °C) hasta que la temperatura de las suspensiones se estabilizó a aproximadamente 90 °C durante 5 minutos. Después de clarificación por centrifugación, los sobrenadantes se cargaron en columnas His GraviTrap (GE Healthcare) previamente equilibradas con tampón de unión His GraviTrap. Después de lavar las columnas con 5 VC de tampón de unión His GraviTrap y 5 VC de tampón de lavado His GraviTrap (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 60 mM), los polipéptidos se eluyeron con 3 VC de tampón de elución His GraviTrap (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM).

40 Las variantes polipeptídicas se purificaron adicionalmente por cromatografía de fase inversa (RPC). Se añadió acetonitrilo (ACN) a una concentración final de 2 % en las fracciones eluidas de His GraviTrap. Las muestras se cargaron en una columna de RESOURCE™ RPC de 3 ml (GE Healthcare), previamente equilibrada con tampón de RPC A (ácido trifluoroacético 0,1 % (TFA), ACN 2 %, agua 98 %). Después de lavar la columna con 5 VC de tampón de RPC A, la proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de 20 VC de tampón de RPC B 0-50 % (TFA 0,1 %, ACN 80 %, agua 20 %). El caudal fue de 5 ml/min y se controló la señal de 280 nm. Se identificaron fracciones que contenían polipéptidos puros por análisis de SDS-PAGE y se agruparon.

45 El tampón de los polipéptidos purificados se reemplazó con Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, por cromatografía de exclusión de tamaño en Columnas de Desalación PD-10 desechables (GE Healthcare).

50 Doce de las quince variantes polipeptídicas se purificaron de forma exitosa: His₆-Z04665, His₆-Z04672, His₆-Z04674, His₆-Z04687, His₆-Z04770, His₆-Z04775, His₆-Z04776, His₆-Z04777, His₆-Z04778, His₆-Z04780, His₆-Z04781 e His₆-Z04899.

Análisis de polipéptidos purificados

Se realizó determinación de la concentración de soluciones polipeptídicas midiendo la absorbancia a 280 nM usando un Espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000. Las proteínas se analizaron adicionalmente con SDS-PAGE y CL-EM.

Para el análisis por SDS-PAGE, se mezcló solución de polipéptidos con Tampón de Muestra LDS (Invitrogen) y se

incubó a 40 °C durante 10 minutos. Se cargaron 10 µg de cada variante polipeptídica en Geles NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen). Los geles se procesaron con Tampón de Ejecución MES SDS (Invitrogen) en una Mini Celda XCell SureLock™ (Invitrogen) empleando Patrón Proteico Preteñido Nítido Novex® (Invitrogen) como marcador de peso molecular y Solución de Tinción de Proteínas PhastGel™ Blue R (GE Healthcare) para tinción.

- 5 Para verificar la identidad de las variantes polipeptídicas, se realizaron análisis de CL/EM usando un sistema Agilent 1100 LC/MSD, equipado con API-ESI y analizador de masa cuádruple sencillo. Las muestras proteicas se diluyeron en Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, a una concentración final de 0,5 mg/ml y se cargaron 10 µl en una columna Zorbax 300SB-C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) (Agilent) a un caudal de 1 ml/min. La solución A contenía TFA 0,1 % en agua y la solución B contenía TFA 0,1 % en ACN. Las proteínas se eluyeron usando un gradiente lineal de 22 minutos de solución B del 15 % al 65 % a 1 ml/min. La separación se realizó a 30 °C. Se controló la señal iónica y la absorbancia a 280 y 220 nm. Los pesos moleculares de las proteínas purificadas se verificaron por análisis de la señal iónica.

Se determinó que la pureza de las variantes polipeptídicas era mayor del 95 % de acuerdo con los análisis de SDS-PAGE y CL/EM.

- 15 *Determinación de la temperatura de fusión (T_m)*

- Se diluyeron variantes polipeptídicas purificadas en Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, a una concentración final de 0,5 mg/ml. Se realizó análisis de dicroísmo circular (DC) en un espectropolarímetro Jasco J-81 0 en una celda con una longitud de camino óptico de 1 mm. En las mediciones de temperatura variable, la absorbancia se midió a 221 nm de 20 °C a 90 °C, con una pendiente de temperatura de 5 °C/min. Las temperaturas de fusión de polipéptido (T_m) se calcularon determinando el punto medio de la transición en la representación de DC frente a temperatura. Para resultados, véase Tabla 8.

Tabla 8. T_m de variantes polipeptídicas de unión a Dynazyme

Designación	T _m (°C)
His ₆ -Z04665	38
His ₆ -Z04672	33
His ₆ -Z04674	35
His ₆ -Z04687	60
His ₆ -Z04770	44
His ₆ -Z04775	45
His ₆ -Z04776	55
His ₆ -Z04777	58
His ₆ -Z04778	43
His ₆ -Z04780	65
His ₆ -Z04781	66
His ₆ -Z04899	39

Análisis de estabilidad frente a calor

- 25 La capacidad para volver a plegarse en la estructura alfa helicoidal original después de someterse a calor era una propiedad requerida de las variantes polipeptídicas descritas anteriormente. Para investigar la reversibilidad estructural, se obtuvieron dos espectros de DC por muestra a 20 °C. Entre las dos mediciones, las muestras se calentaron a 96 °C. Las muestras se mantuvieron a 96 °C durante 2 minutos, y después se enfriaron a 20 °C. Espectros de DC similares antes y después del calentamiento demostrarían que una muestra era estructuralmente reversible. Tres de doce variantes polipeptídicas analizadas se vieron afectadas negativamente por el tratamiento con calor, mientras que se mostró que nueve variantes polipeptídicas recuperaban su estructura alfa helicoidal completamente. Se muestra un solapamiento típico de dos espectros de DC antes y después del calentamiento en la Figura 3.

Análisis de unión de Biacore

Las interacciones entre variantes Z monoméricas marcadas con 12 His₆ seleccionadas de acuerdo con la invención y Dynazyme se analizaron en el instrumento Biacore (GE Healthcare). La proteína diana se inmovilizó en una celda de flujo en la capa de dextrano carboxilado de una superficie de microplaca CM5 (GE Healthcare). La inmovilización se realizó usando química de acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo del fabricante y usando acetato pH 5,5. Se activó una superficie de celda de flujo en la microplaca y se desactivó para su uso como blanco durante las inyecciones de analito. Los analitos, es decir variantes polipeptídicas diluidas en tampón de ejecución HBS-EP (GE Healthcare) a una concentración de 10 μM, se inyectaron en orden aleatorio en duplicados a un caudal de 10 μl/min durante 5 minutos. Después de 10 minutos de disociación, las superficies se regeneraron con una inyección de SDS 0,05 %. Los resultados se analizaron en software BiaEvaluation (GE Healthcare). Se restaron las curvas de la superficie de blanco de las curvas de las superficies de ligando. El análisis mostró una interacción para 5 de las variantes polipeptídicas con la Dynazyme inmovilizada, como se perfila en la Figura 4.

Ejemplo 5 – Estudio comparativo de síntesis química de un polipéptido de una población de acuerdo con la invención15 *Sumario*

En los experimentos que componen este ejemplo, se describe síntesis peptídica de fase sólida (SPPS) de polipéptidos de las poblaciones de acuerdo con la invención, y se compara con la síntesis de un polipéptido basada en el armazón original. Las mutaciones introducidas en cuatro posiciones, es decir [N23T], [A42S], [A46S] y [A54S], permitieron usar una estrategia de síntesis alternativa con precursores de pseudoprolina con la abreviatura simplificada Fmoc-Xxx-Yyy-OH. Usando pseudoprolinas en tres o cuatro de las posiciones descritas anteriormente, es posible sintetizar moléculas de longitud completa con las secuencias:

SEC A: maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK (SEC ID N°: 10)

(en la que ma designa meracптоacetilo acoplado con el extremo N terminal del polipéptido); y

25 SEC B: AEAKYAKEMW IAWEEIRNLP NLNGWQMTAF IAKLLDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKC (SEC ID N°: 11); mientras que la síntesis convencional no produjo el péptido con SEC A.

Síntesis convencional de SEC C: AENKFNKEMW IAWEEIRNLP NLGWQMTAF IASLLDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK (SEC ID N°: 12), que es similar a SEC B pero contiene los aminoácidos del armazón original, dio como resultado una preparación muy impura y una baja producción de péptidos.

30 La introducción de nuevos restos de serina o treonina también permite el uso de dipéptidos de isoácilo, que es una alternativa a pseudoprolina para aumentar la eficacia sintética reduciendo la agregación durante la síntesis peptídica (Sohma y col, Tetrahedron Lett. 47: 3013, 2006). Están disponibles varios de tales componentes básicos de Novabiochem de Merck Biosciences AG.

Fundamento

35 La síntesis peptídica de la molécula de unión a HER2 Z_{HER2:342} (desvelada en el documento WO 2005/003156 como Z_{HER2:107}, y en ocasiones también llamadas Z00342), así como acoplamiento de DOTA con el extremo N terminal para esta molécula es posible y está descrito en la bibliografía (Orlova A y col (2006) Cancer Research 67: 2178-2186). Sin embargo, se observó una gran variación de la producción de péptidos después de síntesis. Las dificultades para sintetizar de forma reproducible el péptido pueden relacionarse tanto con la longitud del péptido como con la secuencia de aminoácidos primaria. Además, los péptidos largos con los grupos reactivos de las cadenas laterales de aminoácidos aún protegidas pueden generar estructuras secundarias desfavorables, por ejemplo láminas beta que pueden perturbar la síntesis peptídica de fase sólida (Quibell M y Johnson T in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach, W. C. Chan, P. D. White Eds, Oxford University Press 2000: 115-135). Una forma de evitar la formación de estructura secundaria durante la síntesis peptídica es el uso de pseudoprolinas. Las pseudoprolinas, con la abreviatura simplificada Fmoc-Xxx-Yyy-OH, pueden usarse si el aminoácido Yyy es serina, treonina o cisteína. Estas pseudoprolinas presentan una estructura de tipo prolina cerrada con la cadena lateral ligada a la cadena principal y pueden convertirse en la estructura de aminoácidos normal por tratamiento ácido (Haack T y Mutter M (1992) Tetrahedron Lett 33: 1589-1592). Las pseudoprolinas están disponibles en el mercado para 14 aminoácidos en posición Xxx (todos los aminoácidos de origen natural excepto Arg, Cys, His, Met, Pro, Thr) junto con serina o treonina en la posición Yyy.

50 La molécula precursora Z_{HER2:342} no tiene treonina ni cisteína en la secuencia primaria. La serina se encuentra solo en las posiciones 33, 39 y 41. Un precursor de pseudoprolina está disponible solo para serina 41 (Q⁴⁰-S⁴¹). Para las dos otras serinas, el aminoácido en la posición Xxx evita el uso de pseudoprolina, puesto que no hay precursores disponibles (R³²-S³³ y P³⁸-S³⁹).

Las mutaciones introducidas en los polipéptidos comprendidos en la población de acuerdo con la invención se dirigen a, pero sin restricción, facilitar la síntesis peptídica. Especialmente las mutaciones en las posiciones 23, 42, 46 y 54, es decir [N23T], [A42S], [A46S] y [A54S] pueden tener la capacidad para resolver dos de los problemas identificados en SPPS: permiten el uso de pseudoprolinas y la región crítica alrededor de las posiciones de aminoácidos 21 a 26 se cambia a la posición 23 reemplazando asparagina con treonina.

Estrategia de síntesis 1

La secuencia de aminoácidos SEC A se ensambló en una resina de poliestireno Fmoc-Lys(Boc)-Wang en un sintetizador de péptidos completamente automático. Esta resina es altamente adecuada para la formación de péptidos con la estrategia de Fmoc. Se acoplaron 57 aminoácidos (con protección de cadena lateral apropiada) en la resina. En la última etapa, el acoplamiento de ácido mercaptoacético protegido con S-tritilo se realizó manualmente.

Etapa 1: Síntesis de Péptidos de Fase Sólida

La resina de poliestireno Fmoc-Lys(Boc)-Wang se transfirió a un reactor de SPPS con un agitador. Se inició después la síntesis con desprotección de Fmoc de la resina, seguido de un procedimiento de acoplamiento con Fmoc-Pro-OH de acuerdo con la descripción general proporcionada posteriormente. Esta etapa se siguió de nuevo de una desprotección de Fmoc y posterior acoplamiento de los derivados de aminoácidos de acuerdo con la secuencia. Después de lavados finales de la resina con isopropiléter (IPE), la resina peptídica se secó en un desecador bajo presión reducida.

Se realizó tanto síntesis peptídica de Fmoc convencional como síntesis usando pseudoprolinas en cuatro posiciones. Para síntesis de péptidos convencional, solo se usaron aminoácidos Fmoc. Para la síntesis de péptidos alternativa, aparte de aminoácidos Fmoc se usaron las siguientes pseudoprolinas: Fmoc-Leu-Thr-OH en la posición 22-23, Fmoc-Ser-Ser-OH en la posición 41-42, Fmoc-Leu-Ser-OH en la posición 45-46 y Fmoc-Asp-Ser-OH en la posición 53-54.

Procedimiento de desprotección de Fmoc

La resina también se trató con piperidina 20 % en N-metil-2-pirrolidona (NMP) para conseguir la escisión del grupo protector N- α -Fmoc. El lavado de la resina se realizó después con NMP.

Procedimiento de acoplamiento

Acoplamiento automático de los derivados de aminoácidos Pro57 a Glu1. Hasta 3 equivalentes del derivado de Fmoc-AA se disolvieron en NMP. Para el acoplamiento, se añadieron 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) en dimetilformamida (DMF) y sym-colidina (2,4,6-trimetilpiridina) en NMP. La solución resultante se mezcló a temperatura ambiente antes de verterla en la resina. Se usó NMP como disolvente. Después de un tiempo de acoplamiento de al menos 15 minutos a 60 °C, la resina se lavó con NMP.

Después de cada procedimiento de acoplamiento, tiene lugar una repetición del acoplamiento con 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TATU) en DMF como reactivo de acoplamiento y con dicloroetano como disolvente de forma automática, seguido de protección con anhídrido acético.

Etapa 2: Acoplamiento de ácido mercaptoacético

Se realizaron acilaciones con 5 equivalentes molares de aminoácido, 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 10 equivalentes de N-etildisopropilamina (DIEA, de Lancaster Synthesis, Morecambe, Inglaterra). El ácido S-tritil-mercaptoacético fue de AnaSpec Inc (San Jose, CA, Estados Unidos).

Etapa 3: Escisión de la resina incluyendo escisión de los grupos de protección restantes

La resina de péptidos se trató con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de agua purificada, etanoditiol (EDT) y triisopropilsilano (TIS). Después de aproximadamente 2 horas de tiempo de escisión a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente 0 °C, y se añadió yoduro de amonio y dimetil sulfuro para reducir la metionina oxidada. Después de un tiempo de escisión adicional de 60 minutos a aproximadamente 0 °C, se redujo el yodo formado con ácido ascórbico. Después de separar por filtrado el producto, se precipitó en IPE en frío, se separó por filtración de nuevo, se lavó con IPE y se secó bajo presión reducida.

Análisis de pureza por HPLC

La pureza de los péptidos de 58 aminoácidos de longitud y algunos intermedios se determinó por HPLC de fase inversa usando una columna Vydac 218 TP54 (5 μ m, 250 x 4,6 mm) y TFA 0,1 %, acetonitrilo 1 % en H₂O y TFA 0,1 % en acetonitrilo como disolvente A y B respectivamente. Se estableció la temperatura de horno de columna a 35 °C. La columna se eluyó con un gradiente del 15 al 45 % de disolvente B en 30 minutos o con un gradiente del 20 al 50 % de B en 30 minutos. La detección de UV fue a 220 nm. La pureza se calculó por normalización de área.

Resultados

Se analizaron el rendimiento y pureza de la molécula con la secuencia SEC A, sintetizada con o sin el uso de pseudoprolinas, por cromatografía de fase inversa analítica. Para seguir el progreso de la síntesis, se tomó una parte pequeña de la resina de síntesis después de varias etapas de acoplamiento y se analizó con respecto a la presencia, pureza y rendimiento del intermedio peptídico deseado. La Figura 5 muestra el análisis de HPLC del intermedio peptídico de 41 aminoácidos de longitud (aminoácidos 18-58). En esta etapa de la síntesis peptídica, se identificó un pico de péptido claro y predominante con la secuencia correcta (TA=15:33 min, rendimiento 49 %) si la síntesis se realizó usando pseudoprolinas (Figura 5 A). La síntesis de Fmoc convencional, sin embargo, dio como resultado un gran número de picos de péptidos pequeños y dos picos principales con tamaño similar, pero bajo rendimiento. Uno de estos dos picos (TA = 20,82 min) se identificó como el péptido intermedio con la secuencia correcta (aa 18-58) (Figura 5 B). El péptido de longitud completa (aminoácidos 1-58) se obtuvo solamente si la síntesis se realizó usando pseudoprolinas. La Figura 6A muestra un pico de producto sencillo con un rendimiento del péptido final del 26 %. La síntesis de Fmoc convencional, sin embargo, no produjo el producto peptídico final. El análisis del intermedio de 49 aminoácidos de longitud (aminoácidos 10-58) de la síntesis convencional reveló que el intermedio deseado no pudo detectarse y la síntesis se suspendió (Figura 6B).

Estrategia de síntesis 2

Se ensamblaron dos moléculas usando la estrategia de Fmoc en un sintetizador de péptidos completamente automático con un horno microondas integrado.

Los 59 restos aminoacídicos de SEC B, basados en la secuencia de armazón de la invención, se ensamblaron (con protección de cadena lateral apropiada) en una resina de poliestireno Fmoc-Cys(Trt)-Wang LL.

Los 58 restos aminoacídicos de SEC C, basados en el armazón de molécula Affibody[®] original, se ensamblaron (con protección de cadena lateral apropiada) en una resina de poliestireno de Fmoc-Lys(Boc)-Wang LL.

La resina Wang LL es altamente adecuada para la formación de péptidos con la estrategia de Fmoc.

Etapas 1: Síntesis de péptidos de fase sólida

La resina de poliestireno se transfirió automáticamente a un recipiente de reacción de SPPS por el sintetizador (Liberty, CEM Corporation, NC Estados Unidos). Se inició después la síntesis con desprotección de Fmoc de la resina, seguido de un procedimiento de acoplamiento con el siguiente aminoácido protegido por Fmoc (Fmoc-AA) de acuerdo con la descripción general proporcionada posteriormente. Esta etapa se siguió de nuevo de una desprotección de Fmoc y posterior acoplamiento de los derivados de aminoácidos de acuerdo con la secuencia. Después de los lavados finales de la resina con diclorometano (DCM), la resina de péptidos se secó bajo presión reducida. El péptido completo SEC C se preparó por síntesis peptídica de Fmoc convencional, mientras que se usaron pseudoprolinas en las posiciones en SEC B en las que esto se posibilitó por las mejoras realizadas al armazón. Se usaron las siguientes pseudoprolinas: Fmoc-Ser-Ser-OH en la posición 41-42, Fmoc-Leu-Ser-OH en la posición 45-46 y Fmoc-Asp-Ser-OH en la posición 53-54.

Procedimiento de desprotección de Fmoc

La resina se trató con piperazina 5 % en NMP, con irradiación de microondas, para conseguir la escisión del grupo protector de N- α -Fmoc. El lavado de la resina se realizó después con NMP.

Procedimiento de acoplamiento

Acoplamiento automático de los derivados de aminoácidos Cys59 a Ala1 (para SEC B) y Lys58 a Ala1 (para SEC C). Se disolvieron hasta 5 equivalentes del Fmoc-AA en NMP. Para el acoplamiento, se añadieron O-(benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) y N-hidroxibenzotriazol (HOBt) en dimetilformamida (DMF), N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) en NMP a la resina a una relación molar de 1:1:1:2 (AA/HBTU/HOBt/DIPEA). La mezcla se agitó burbujeando gas de nitrógeno a través del fondo del recipiente de reacción. Después de un tiempo de acoplamiento de al menos 5 minutos a 75-80 °C con energía añadida usando irradiación de microondas, la resina se lavó con NMP.

Después de cada procedimiento de acoplamiento, se realizó una protección con anhídrido acético automática.

Etapas 2: Escisión de la resina que incluye escisión de los grupos de protección restantes.

La resina peptídica se trató con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de agua purificada, etanoditiol (EDT) y triisopropilsilano (TIS). Después de aproximadamente 2 horas de escisión a temperatura ambiente, la mezcla de escisión se filtró y la resina se aclaró con agua/TFA 95 % puro. El filtrado se añadió lentamente a metil terc-butil éter enfriado (MTBE). El precipitado se centrifugó y se retiró el MTBE. El sólido se resuspendió en éter y la operación se repitió un total de tres veces. Después de la última retirada de éter, el sólido se resuspendió en agua/TFA 0,1 %, se dejó que el éter restante se evaporara y la solución se congeló antes de liofilización.

Análisis de masa y pureza por HPLC-MS

La pureza de los péptidos se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas en línea (HPLC-MS) usando un Agilent 1100 HPLC/MSD equipado con ionización por electronebulización (IEN) y un cuadrupolo sencillo. La HPLC se procesó usando una columna Zorbax 300SB C18 (3,5 μ m, 150 x 4,6 mm) y agua/TFA 0,1 % y TFA 0,1 %/acetonitrilo (ACN) como disolvente A y B respectivamente. La temperatura del horno de columna se ajustó a 30 °C. La columna se eluyó con un gradiente de disolvente B del 15 al 55 % en 40 minutos. La detección de UV fue a 220 nm. La pureza se calculó por normalización de área. El software usado para el análisis de masas y evaluación fue ChemStation Rev. B. 02.01. (Agilent).

Resultados

El rendimiento y pureza de las moléculas SEC B y SEC C se analizó por cromatografía de fase inversa analítica. Los péptidos de longitud completa se obtuvieron en ambas síntesis, sin embargo con un rendimiento mucho mayor para SEC B. La Figura 7A muestra, para SEC B, un pico de producto principal (TR = 41,48 min) con la masa esperada y un rendimiento del péptido final del 15 %. Se descubrió que un pico adicional (TR = 41,21 min) con un rendimiento del 8 % tenía una masa que era 72 Da más alta que la masa esperada del producto de longitud completa. Se cree que esto se debe a una reacción secundaria en el resto aminoacídico Cys59. Dependiendo del tipo de reacción secundaria, esto puede producirse durante la síntesis o durante la escisión del péptido de la resina. Optimizando el protocolo de escisión y/o síntesis, esta reacción secundaria podría minimizarse y aumentarse de este modo el rendimiento, en este caso hasta un rendimiento total del 23 %.

La síntesis de Fmoc convencional de SEC C, sin embargo, dio como resultado un gran número de picos de péptidos pequeños (Figura 7 B). Uno de los picos principales (TR = 43,60 min) se identificó como el péptido de longitud completa con la masa esperada. El rendimiento de este producto fue del 4 %.

Ejemplo 6 – Inmunogenicidad de variantes polipeptídicas originales y de la invención*Sumario*

En este ejemplo, la inmunogenicidad de una variante polipeptídica original y una de la invención se comparó *in vivo*. Se administraron moléculas dimericas a ratas, y las respuestas de anticuerpo específicas se determinaron en un ensayo de anticuerpo antifármaco (ADA). La molécula con las mutaciones de armazón introducidas de acuerdo con la invención presenta una respuesta de anticuerpo más baja y retardada en comparación con la variante Z original.

Clonación y producción de polipéptidos

Se usaron dos polipéptidos de unión específica de Taq-polimerasa fusionados con el dominio de unión a albúmina ABD035 (Jonsson y col (2008) Protein Eng Des Sel 8: 515-27) en el estudio:

1. (Z01154)₂-ABD035: armazón original
2. (Z03229)₂-ABD035: armazón de la invención.

Se clonaron fragmentos amplificados por PCR e hibridados de Z01154 y Z03229 con salientes de Accl como dímeros en los vectores de expresión derivados de pET digerido con Accl (Novagen) pAY492 y pAY1450, respectivamente. Los vectores resultantes se digirieron con Accl-NotI y se ligaron con fragmentos ABD035 que se habían amplificado por PCR con salientes Accl y NotI, generando las construcciones pAY1827 (que codifica MGSSLQ-[Z01154]-[Z01154]-VD-[ABD035]) y pAY2292 (que codifica MGSSLQ-[Z03229]-[Z03229]-VD-[ABD035]). Los plásmidos se transformaron en células *E. coli* BL21 (DE3) competentes y se produjeron proteínas por fermentación, esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 3. Las células sedimentadas se suspendieron en [Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, Benzonase[®] 25 U/ml (Merck, N° 1.01654.0001), pH 8,0] y se rompieron por sonicación en hielo. Los sobrenadantes clarificados se cargaron en una columna empaquetada con Sepharose activado con CNBr (GE Healthcare, N° 17-0981-03) acoplado de forma interna con albúmina de suero humano. La columna se preequilibró en 1 x TST [Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0,05 %, pH 8,0]. Después de la aplicación de la muestra, se realizó lavado con TST 1x seguido de NH₄Ac 5 mM pH 5,5, hasta que no se observó reducción de la señal de Abs₂₈₀. Las proteínas unidas se eluyeron con Hac 0,5 M, pH 2,8. Las muestras eluidas se complementaron con acetonitrilo a una concentración final de 2 % y se purificaron adicionalmente por cromatografía de fase inversa en una columna Resource RPC (GE Healthcare, N° 17-1182-01). Se usó [acetonitrilo 2 %, TFA 0,1 % en agua] como tampón de ejecución y las muestras se eluyeron usando un gradiente lineal de 0-50 % de [acetonitrilo 80 %, TFA 0,1 % en agua] sobre 25 volúmenes de columna. Se realizó intercambio de tampón a [fosfato sódico 5 mM, NaCl 150mM, pH 7,2] usando una columna de Desalación HiPrep 26/10 (GE Healthcare, N° 17-5087-01). Se verificó la pureza de la muestra por análisis de SDS-PAGE y CL/EM como se describe en el Ejemplo 3. Se retiraron las trazas de endotoxinas en un gel de retirada de endotoxina de AffinityPak Detoxi-Gel (Thermo, N° 20344) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. No se detectaron endotoxinas en los ensayos de coagulación de gel LAL por APL (Apoteket Produktion & Laboratorier AB, Suecia). Las muestras estaban sin agregados solubles como se verificó por cromatografía de exclusión por tamaño llevada a cabo en una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare, N° 17-5174-01) usando PBS 1 x como tampón de ejecución, un caudal de 0,5 ml/min y un volumen de muestras de 100 μ l con una concentración de 1 mg/ml.

Administración y esquemas de toma de muestras

El estudio animal se realizó en Agrisera AB (Vännäs, Suecia) con permiso del comité de ética animal local. Se inyectó a ratas hembra Sprague Dawley divididas en tres grupos por vía subcutánea (Z01154)₂-ABD035, (Z03229)₂-ABD035 o un control de tampón como se perfila en la Tabla 9. Se proporcionaron inyecciones los días 0, 4, 7, 14, 21 y 28. Se recogieron muestras de sangre de 250 µl de cada animal el día -1 (antes del suero) y los días 6, 13, 20 y 35. Todos los animales se sacrificaron el día 35. Se dejó coagular las muestras de sangre recogidas durante una noche a 4 °C y los sueros obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Tabla 9. Esquema de administración de muestras

Grupo	Número de animales	Molécula	Medio de administración	mg/animal/inyección	ml/animal/inyección
1	8	(Z01154) ₂ -ABD035	s.c.	0,125	0,1
2	8	(Z03229) ₂ -ABD035	s.c.	0,125	0,1
3	4	Control de tampón: fosfato sódico 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2	s.c.	-	0,1

Ensayo de anticuerpo anti-fármaco (ADA)

10 Para analizar la presencia de anticuerpos anti-(Z01154)₂-ABD035 y anti-(Z03229)₂-ABD035, se realizaron tres tipos de análisis ELISA. Todas las muestras se exploraron inicialmente con respecto a la presencia de anticuerpos reactivos seguido de un ensayo de confirmación para verificar la especificidad. Las muestras de suero con anticuerpos específicos frente a variantes de Z se valoraron posteriormente para cuantificar la titulación de anticuerpos anti-(Z01154)₂-ABD035 y anti-(Z03229)₂-ABD035.

15 Para la exploración de muestras de suero, se revistieron placas de ELISA (placas de media área de 96 pocillos, Costar, N° 3690) durante una noche con (Z01154)₂-ABD035 o (Z03229)₂-ABD035 diluidas en tampón de revestimiento (Sigma, N° C3041) hasta una concentración final de 2 µg/ml. Se añadieron 50 µl de la solución de revestimiento por pocillo y las placas se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron dos veces manualmente con agua desionizada y posteriormente se bloquearon durante 2 horas con PBS-Caseína 100 µl/pocillo (PBS con Caseína 0,5 % (Sigma, N° 8654)). La solución de bloqueo se retiró y se añadieron muestras de suero (50 µl/pocillo) diluidas 1:50 en tampón de bloqueo. Después de 1,5 horas de incubación a TA, las placas se lavaron en un lavador de ELISA automático (Scanwasher 300, Scatron) con PBST (PBS con Tween 20 0,05 % (Acros Organics, N° 233362500)). Para detectar anticuerpos de rata contra variantes Z, se añadieron 50 µl por pocillo de IgG anti-rata conjugada con HRP (Southern Biotech, N° 3050-05), diluida 1:6000 en PBS-Caseína. Después de 1 hora de incubación, las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente y se añadieron 50 µl/pocillo de solución de sustrato (Immunopure® TMB, Pierce, N° 34021). Las placas se incubaron a TA en oscuridad, y se detuvo el desarrollo del color después de 15 minutos con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 M (VWR, N° 14374-1). Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (Victor³, Perkin Elmer).

30 El procedimiento de ELISA descrito anteriormente también se usó para los ensayos de ELISA de confirmación y valoración, pero con algunas alteraciones. Para el ensayo de confirmación, las muestras de suero se diluyeron 1:50 en PBS-Caseína o en PBS-Caseína que incluía 1 µg/ml de variante polipeptídica respectiva. Se consideró que las muestras de suero con una reducción de la señal de DO de 45 % o más contenían anticuerpos específicos contra variantes de Z. Para ensayo de valoración, se diluyeron las muestras de suero 1:50 en PBS-Caseína y después en series de diluciones de 2 veces o 5 veces hasta que cruzaron el punto de corte específico de placa para permitir que se calcule un valor de titulación para la muestra.

Durante el desarrollo del ensayo se determinaron los siguientes parámetros clave:

- *Dilución mínima:* 1:50
- *Fondo no específico (NSB):* DO₄₅₀ de un grupo de suero de rata normal (ratas Sprague Dawley, Scanbur) usado como matriz de dilución e incluido en cada placa durante todo el análisis
- 40 • *Punto de corte del ensayo:* DO₄₅₀ media de sueros de rata normales de 30 individuos más 1,645 veces las desviaciones típicas de la media. Se obtuvo un valor de 0,11 tanto para (Z01154)₂-ABD035 como para (Z03229)₂-ABD035.
- *Factor de normalización.* Punto de corte del ensayo dividido por la media de DO₄₅₀ del NSB: 1,87 y 1,86 para (Z01154)₂-ABD035 y (Z03229)₂-ABD035, respectivamente.

45 Durante el análisis de la muestra, el *punto de corte específico de placa* se determinó después como: Media de DO₄₅₀ de NSB específico de placa, multiplicado por el factor de normalización.

5 Se usó suero de ratas (ratas Sprague Dawley hiperinmunizadas, Agrisera) que se había confirmado que contenían anticuerpos contra las dos variantes polipeptídicas para preparar muestras de control positivas (CP) incluidas en cada placa durante todo el análisis: *CP Alto*: suero de control positivo diluido 1:4 en la matriz antes de la dilución mínima en PBS-Caseína. Este CP tiene valores de DO altos por encima del punto de corte de ensayo/placa. *CP Bajo*: suero de control positivo diluido 1:300 en matriz antes de la dilución mínima en PBS-Caseína. Este CP tiene valores de DO que quedan justo por encima del punto de corte de ensayo/placa.

10 Los valores de CP Bajo y CP Alto se usaron para preparar los controles de calidad de titulación LoQC1-5 y HiQC1-5. El CP Bajo y CP Alto se diluyeron 1:50 en PBS-Caseína para obtener LoQC1 y HiQC1 respectivamente. Estos se diluyeron después adicionalmente en PBS-Caseína para obtener LoQC2 (1:100), LoQC3 (1:200), LoQC4 (1:400) y LoQC5 (1:800), y HiQC2 (1:250), HiQC3 (1:1250), HiQC4 (1:6250) y HiQC5 (1:31250), respectivamente.

Los valores de titulación se calcularon usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc). Brevemente, los valores de DO₄₅₀ se representaron frente a dilución logarítmica y la titulación de la muestra se definió como la dilución logarítmica en el punto de corte específico de placa.

Resultados

15 La comparación *in vivo* entre las moléculas original ((Z01154)₂-ABD035) y de la invención ((Z03229)₂-ABD035) mostró que la molécula de la invención era menos inmunogénica. La respuesta varió considerablemente entre individuos y aumentó a lo largo del tiempo. La titulación pudo determinarse en tres individuos que recibieron la molécula original en comparación con dos individuos que recibieron la molécula de la invención. La titulación real también fue más baja en el grupo que recibió la molécula de la invención (Tabla 10). La razón para ver que pocos animales desarrollan una respuesta de anticuerpo puede deberse a la molécula ABD fusionada, que previamente se ha mostrado que reducía la inmunogenicidad de un polipéptido fusionado (véase por ejemplo, documento WO 2005/097202).

Tabla 10. Respuestas inmunes en ratas a las que se proporcionó una variante polipeptídica original o una de la invención

Tiempo (días)	Grupo 1 (Z01154) ₂ -ABD035 n=8		Grupo 2 (Z03229) ₂ -ABD035 n=8		Grupo 3 control de tampón n=4	
	Respuesta específica (nº de animales)	Titulación Media±DT	Respuesta específica (nº de animales)	Titulación Media±DT	Respuesta específica (nº de animales)	Titulación Media±DT
-1	0	-	0	-	0	-
6	0	-	0	-	0	-
13	1	2,9	0	-	0	-
20	2	3,4 (± 1,0)	1	2,1	0	-
27	3	2,7 (± 1,0)	1	2,4	0	-
35	2	3,4 (± 1,3)	2	2,8 (± 0,1)	0	-

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AFFIBODY AB

5 <120> VARIANTES POLIPEPTÍDICAS

<130> 21039128

<150> EP07150394
 <151> 21-12-2007

10 <150> US 61/009.171
 <151> 26-12-2007

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> población artificial de variantes polipeptídicas

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(4)

30 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

60 <400> 1

Glu Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Glu Ile Xaa Xaa Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15
Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Ala Phe Ile Xaa Lys Leu Xaa Asp Asp Pro Ser
20 25 30
Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln
35 40 45

5 <210> 2
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> población artificial de variantes polipeptídicas
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(9)

 15 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 45 <400> 2

ES 2 383 574 T3

Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Glu Ile Xaa Xaa
1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Thr Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Ala Phe Ile Xaa Lys Leu
20 25 30

Xaa Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ser Gln
50

REIVINDICACIONES

1. Una población de variantes polipeptídicas basadas en un armazón común, comprendiendo cada polipéptido en la población la secuencia de aminoácidos de armazón
EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNSQ, (SEC ID N°: 1)
 5 en la que cada X individualmente corresponde a un resto aminoacídico que varía en la población.

2. Una población de variantes polipeptídicas de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos del armazón es

**AKYAK EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE
 AKKLNSQ,
 (SEC ID N°: 2)**

en la que cada X corresponde individualmente a un resto aminoacídico que varía en la población.

10 3. Una población de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende al menos 1×10^4 moléculas polipeptídicas únicas.

4. Una población de polinucleótidos, **caracterizada porque** cada miembro de la misma codifica un miembro de una población de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

15 5. Una combinación de una población de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con una población de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 4, en la que cada miembro de dicha población de polipéptidos se asocia física o espacialmente con el polinucleótido que codifica ese miembro mediante medios para acoplamiento de genotipo-fenotipo.

6. Un procedimiento para seleccionar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada de una población de polipéptidos, que comprende las etapas de:

- 20 (a) proporcionar una población de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
 (b) poner la población de polipéptidos en contacto con la diana predeterminada en condiciones que permitan la interacción específica entre la diana y al menos un polipéptido deseado que tenga una afinidad por la diana; y
 25 (c) seleccionar, basándose en dicha interacción específica, el al menos un polipéptido deseado de la población restante de polipéptidos.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etapa (a) comprende las etapas preparatorias de proporcionar una población de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 4 y expresar dicha población de polinucleótidos para producir dicha población de polipéptidos, en la que cada miembro de dicha población de polipéptidos se asocia física o espacialmente con el polinucleótido que codifica ese miembro mediante medios para acoplamiento de genotipo-fenotipo.
 30

8. Un procedimiento para aislar un polinucleótido que codifica un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- 35 - seleccionar dicho polipéptido deseado y el polinucleótido que lo codifica a partir de una población de polipéptidos usando el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7; y
 - aislar el polinucleótido separado de este modo que codifica el polipéptido deseado.

9. Un procedimiento para identificar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- 40 - aislar un polinucleótido que codifica dicho polipéptido deseado usando el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8; y
 - secuenciar el polinucleótido para establecer por deducción la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido deseado.

10. Un procedimiento para seleccionar e identificar un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada a partir de una población de polipéptidos, que comprende las etapas de:

- 45 (a) sintetizar cada miembro de una población de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un vehículo o perla separado;
 (b) seleccionar o enriquecer los vehículos o perlas basándose en la interacción del polipéptido con la diana predeterminada; y
 (c) identificar el polipéptido por metodología de caracterización de proteínas.

11. Un procedimiento para la producción de un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- aislar e identificar un polipéptido deseado usando el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9; o
- 5 - seleccionar e identificar un polipéptido deseado usando el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10; y
- producir dicho polipéptido deseado.

12. Un procedimiento para la producción de un polipéptido deseado que tenga una afinidad por una diana predeterminada, que comprende las etapas de:

- (a1) aislar un polinucleótido que codifique dicho polipéptido deseado usando el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8; o
- 10 (a2) retrotraducir un polipéptido identificado usando el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10; y
- (b) después de (a1) o (a2), expresar el polinucleótido aislado de este modo para producir dicho polipéptido deseado,

13. Un procedimiento para la producción de un primer polipéptido basado en un armazón, que comprende las etapas de

15 proporcionar un segundo polipéptido que tenga afinidad por una diana predeterminada estando dicho segundo polipéptido basado en un armazón original derivado de SpA, y

mutar los aminoácidos del armazón original para generar el primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del armazón

20 **EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNDSQ (SEC ID N°: 1),**

en la que cada X individualmente corresponde a un resto aminoacídico que se conserva del segundo polipéptido.

14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha secuencia de aminoácidos del armazón es

**AKYAK EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE
AKKLNDSQ,
(SEC ID N°: 2)**

25 en la que cada X corresponde individualmente a un resto aminoacídico que se conserva del segundo polipéptido.

15. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, en el que dicho armazón original comprende una secuencia de aminoácidos del armazón seleccionada de

EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXSLXDD PSQSANLLAE AKKLNDAQ (SEC ID N°: 3) y

**NKFNK EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXSLXDD PSQSANLLAE
AKKLNDAQ (SEC ID N°: 4),**

30 en la que cada X corresponde individualmente a cualquier resto aminoacídico.

16. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que dicho armazón original deriva de SpA dominio B y comprende una mutación G29A, que corresponde a A en la posición 22 en SEC ID N°: 1 y A en la posición 27 en SEC ID N°: 2.

35 17. Un polipéptido que tiene afinidad por una diana predeterminada, que puede obtenerse por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-16 y comprende la primera secuencia de aminoácidos del armazón

EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNDSQ, (SEC ID N°: 1),

40 en la que cada X corresponde a un resto aminoacídico seleccionable de forma aleatoria en un segundo polipéptido basado en una secuencia de aminoácidos del armazón original y en el que dicho segundo polipéptido tiene afinidad por dicha diana predeterminada.

18. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos del armazón es

**AKYAK EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE
AKKLNDSQ,
(SEC ID N°: 2)**

en la que cada X corresponde a un resto aminoacídico seleccionable de forma aleatoria en un segundo polipéptido basado en una secuencia de aminoácidos del armazón original y en el que dicho segundo polipéptido tiene afinidad por dicha diana predeterminada.

- 5 19. Uso de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-18 como un reactivo de detección, reactivo de captura o reactivo de separación.
20. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-18 para su uso en terapia.
21. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-18 para su uso como un agente de diagnóstico.
- 10 22. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-18 en el que dicha diana se selecciona de TNF- α , insulina y Taq polimerasa.

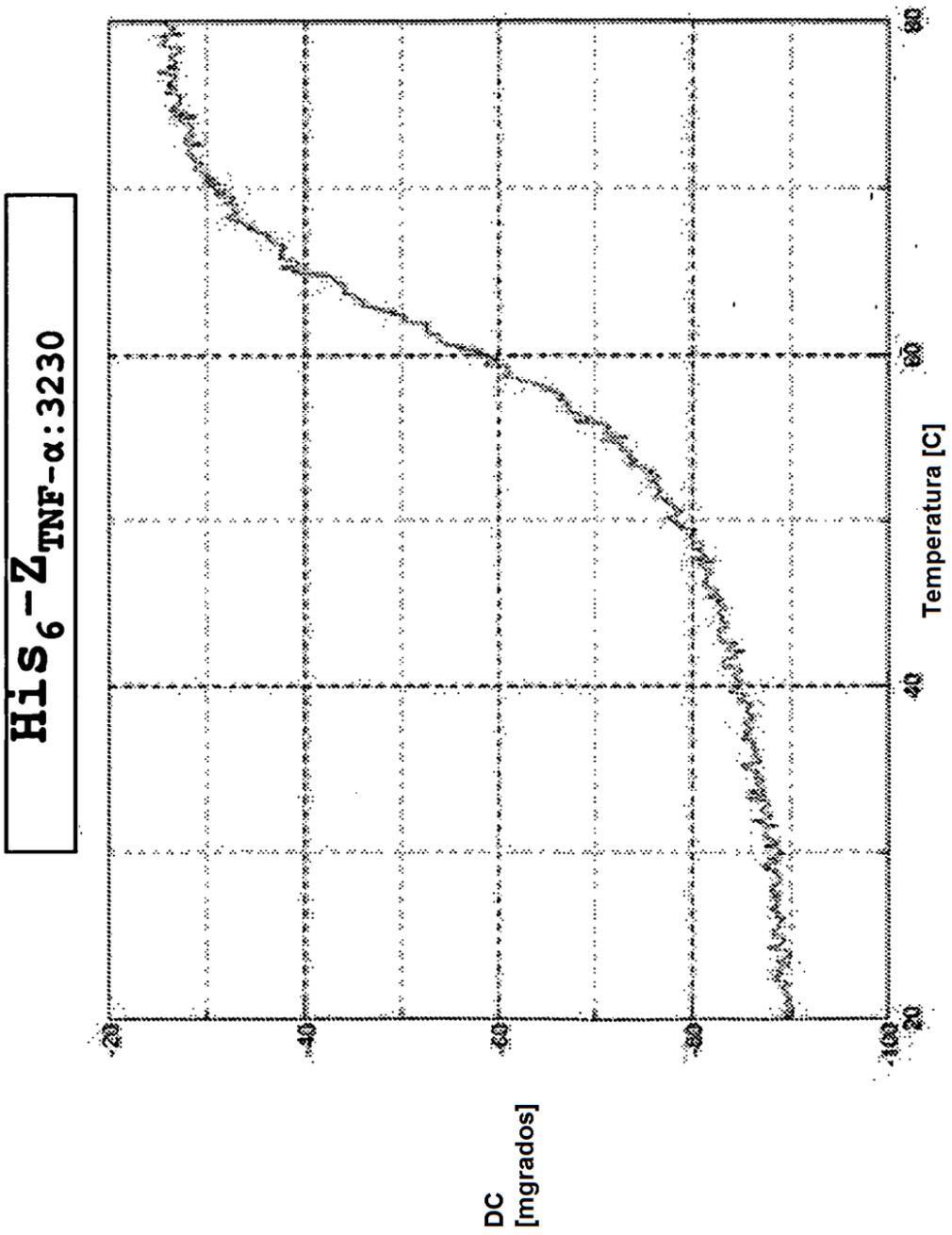


FIGURA 1

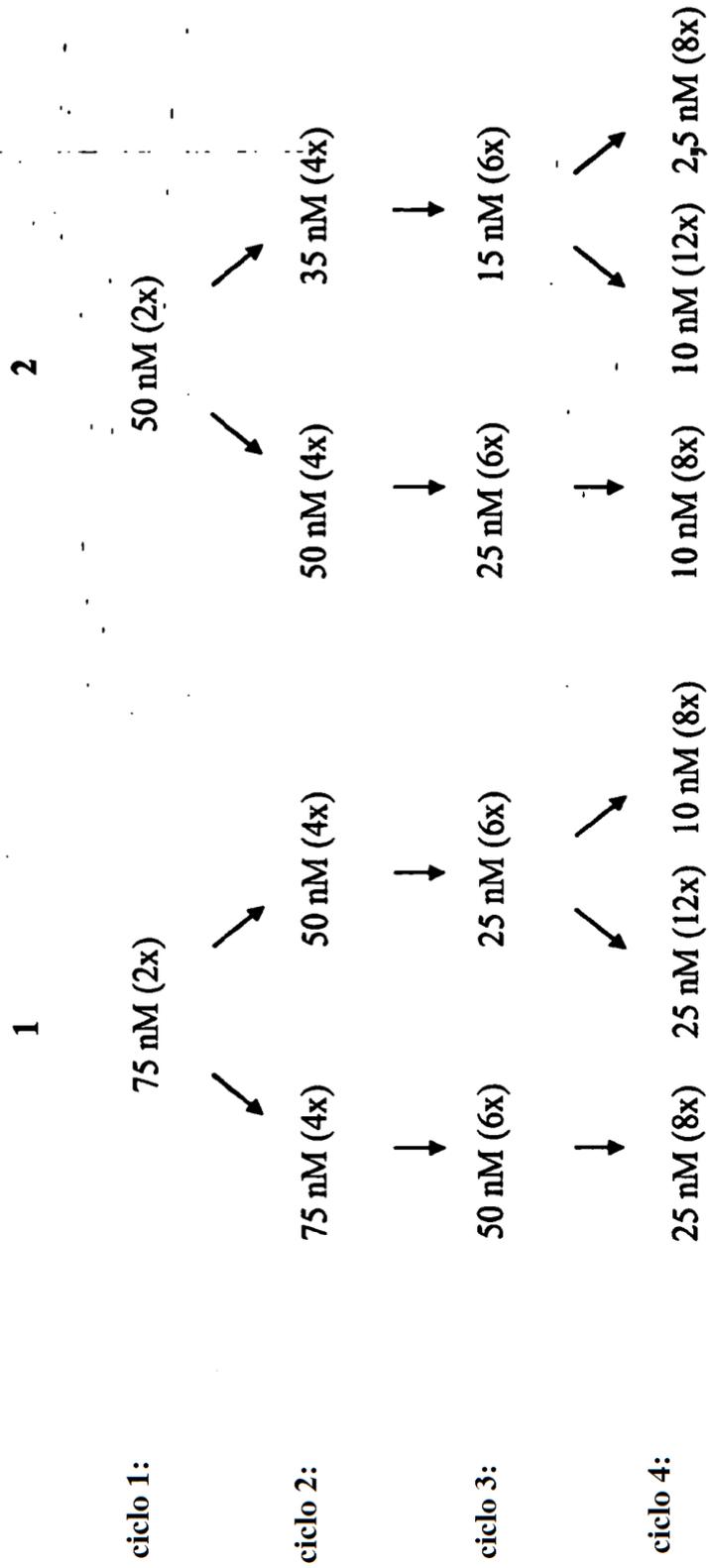


FIGURA 2

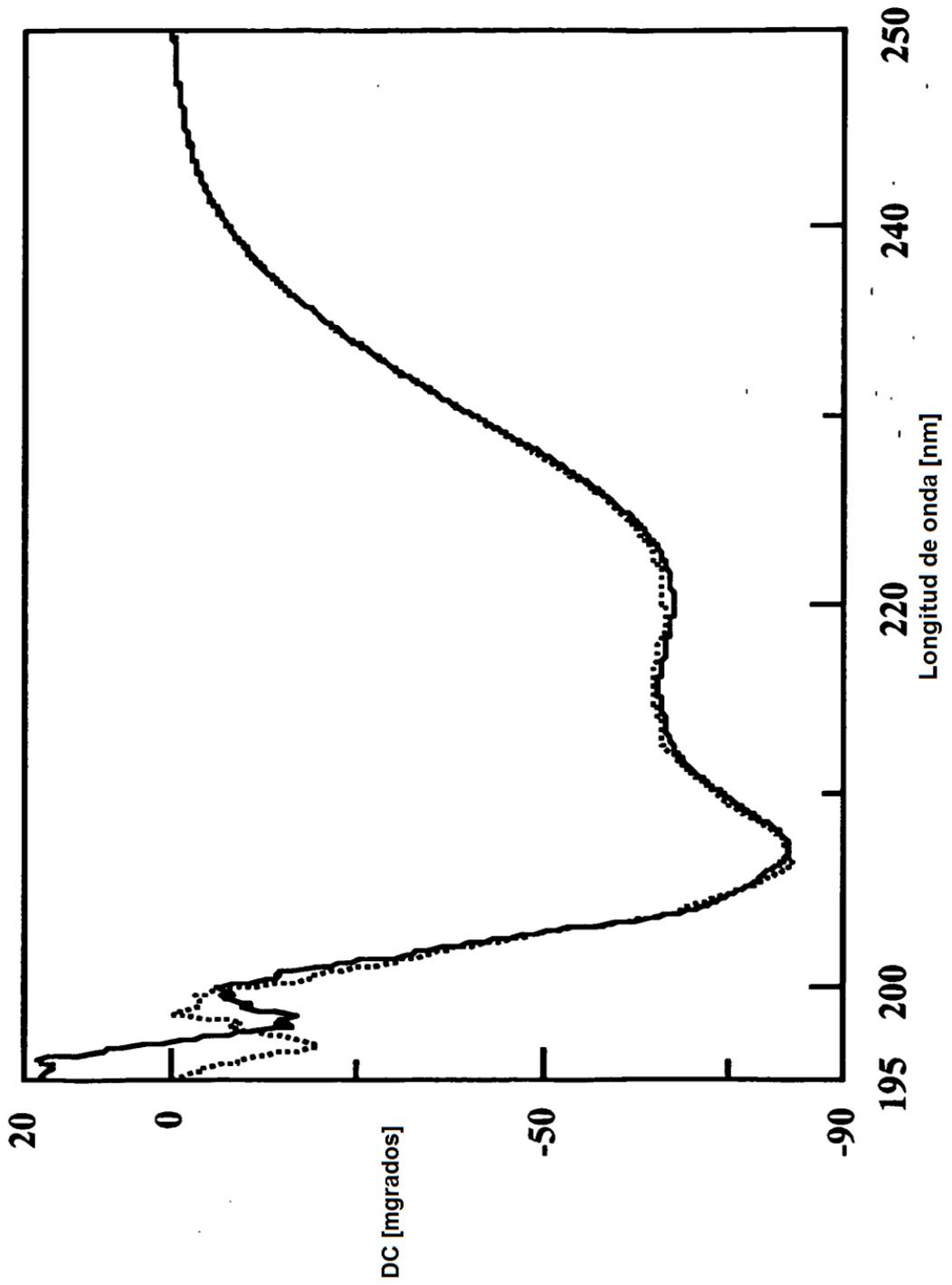


FIGURA 3

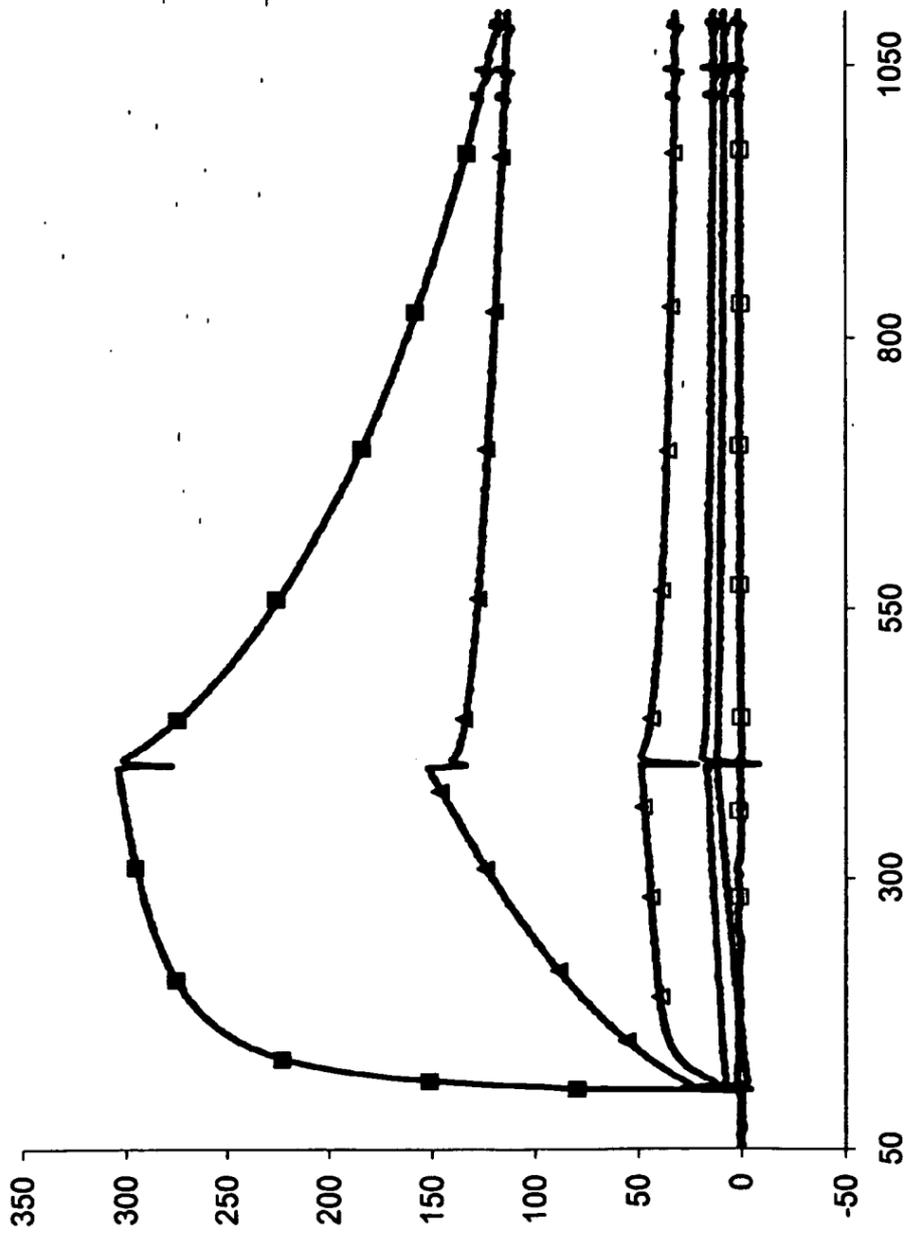


FIGURA 4

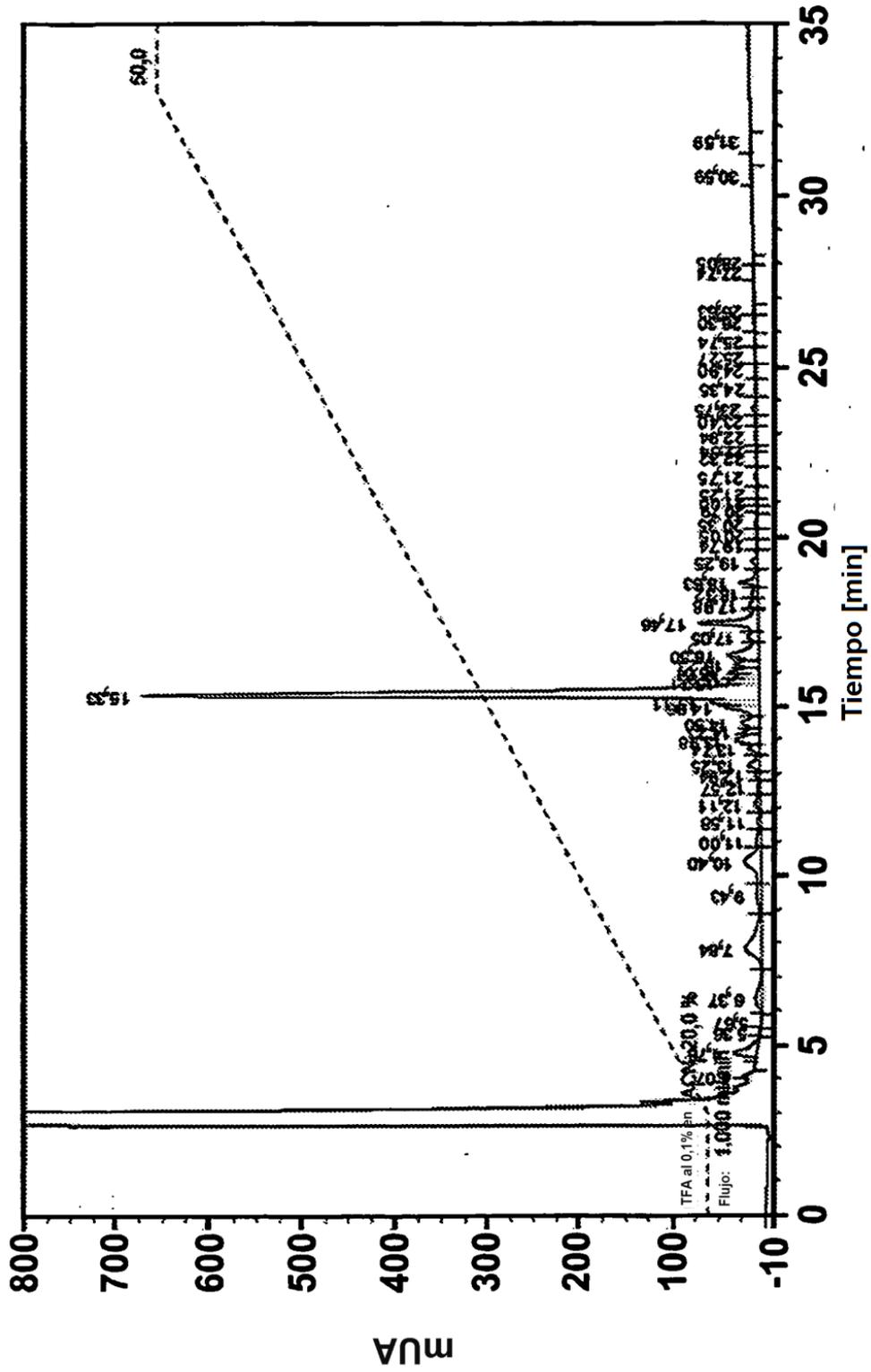


FIGURA 5A

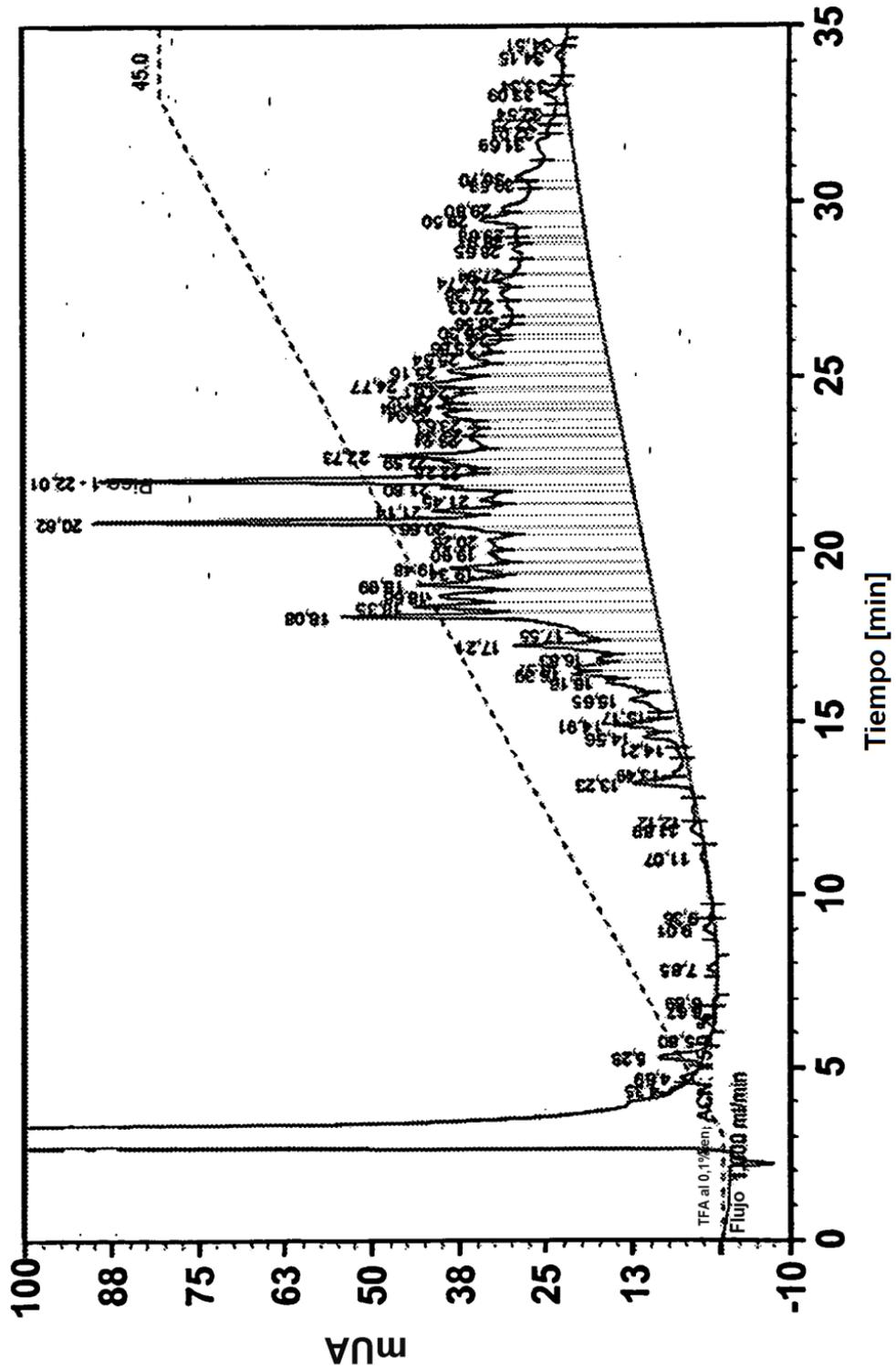


FIGURA 5B

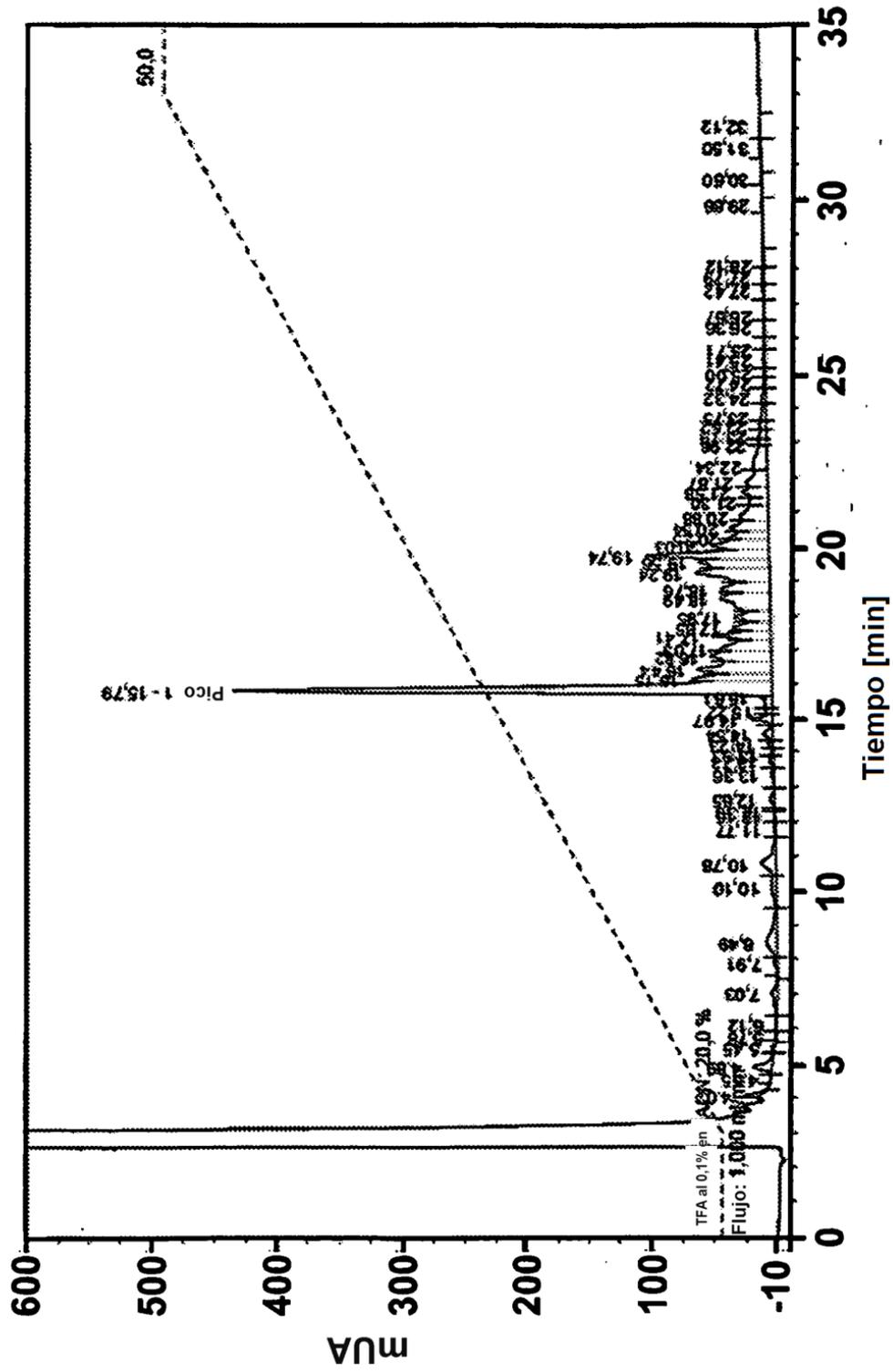


FIGURA 6A

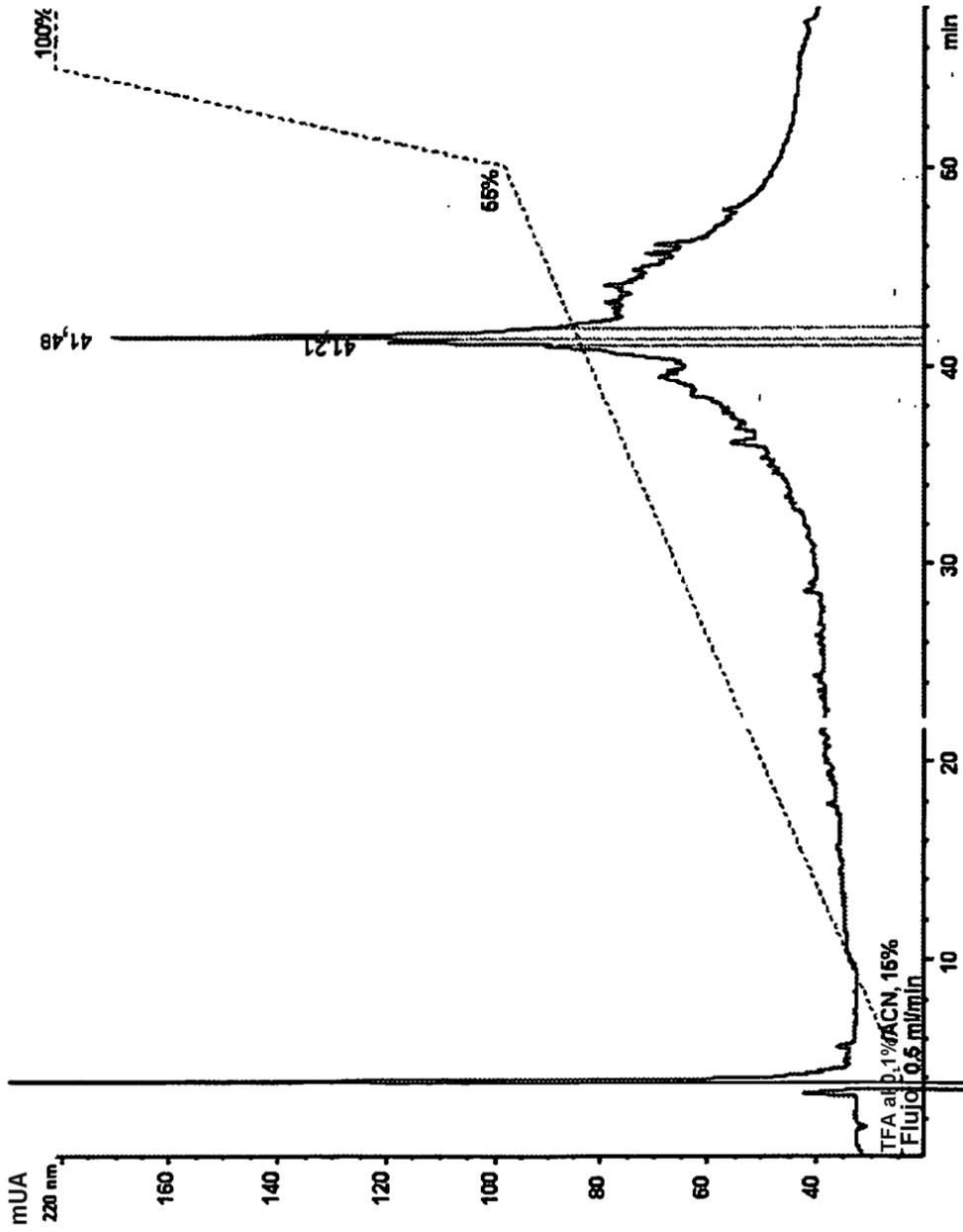


FIGURA 7A

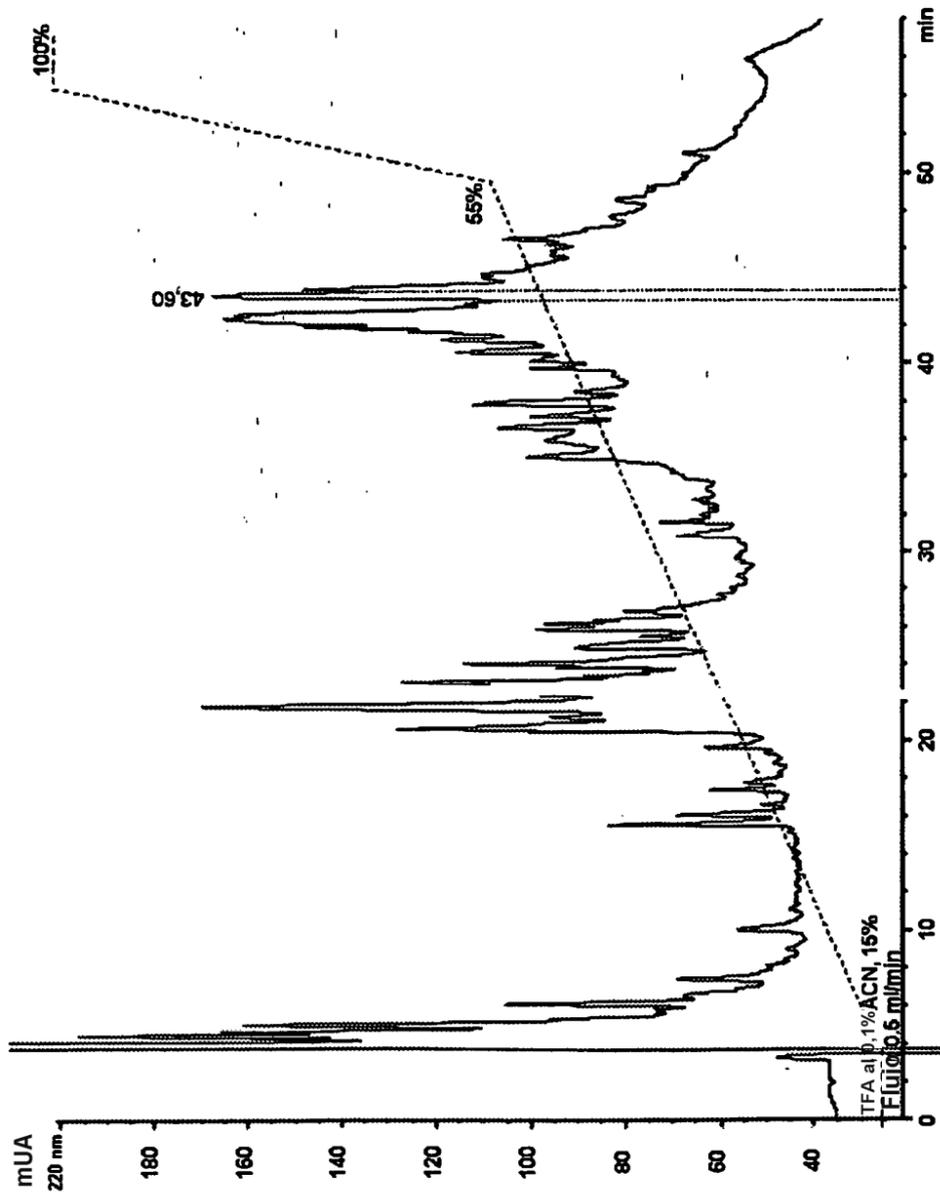


FIGURA 7B