

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 310**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2010 PCT/US2010/026611**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10104821**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2010 E 10751262 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2406399**

54 Título: **Proteínas mirac**

30 Prioridad:

**09.03.2009 US 209489 P**

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

**28.03.2018**

73 Titular/es:

**BIOATLA, LLC (100.0%)  
11085 Torreyana Road, Suite 100  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SHORT, JAY, M.;  
CHANG, HWAI, WEN;  
FREY, GERHARD y  
FROST, GREGORY**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 661 310 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

Proteínas mirac

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con el campo de la evolución y la actividad de anticuerpos. Específicamente, la presente invención se relaciona con un método para generar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos a partir de un anticuerpo silvestre, en particular anticuerpos o fragmentos de anticuerpos terapéuticos, y que son, opcionalmente, inactivados, reversible o irreversiblemente, en una condición fisiológica normal. Por ejemplo, los anticuerpos evolucionados pueden estar virtualmente inactivos a temperatura corporal, pero son activos a temperaturas más bajas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 Existe una cantidad considerable de literatura que describe el potencial para proteínas evolutivas, para una variedad de características, especialmente enzimas, por ejemplo, para ser estabilizados con el fin de operar bajo diferentes condiciones. Por ejemplo, enzimas han sido evolucionadas para estabilizarse a temperaturas mayores, con actividad variante. En situaciones en las que hay una mejora en la actividad a la temperatura alta, una porción sustancial de la mejora puede ser atribuida a la incrementada actividad enzimática, comúnmente estimada por la regla Q10, en donde se estima que, en el caso de una enzima, el cambio se duplica por cada aumento de 10 grados Celsius. Además, existen ejemplos de mutaciones naturales que desestabilizan proteínas cuando se encuentran bajo sus condiciones normales de operación, tal como la temperatura silvestre de la molécula. Para mutaciones de temperatura, dichas mutaciones pueden ser activas a las temperaturas más bajas, pero, generalmente, se encuentran activas a un nivel más bajo en comparación con las moléculas silvestres (también descritas típicamente por una reducción en actividad guiada por la Q10 o reglas similares).

Es deseable generar moléculas útiles que son activadas condicionalmente, por ejemplo, virtualmente inactivas a condiciones silvestres pero activas bajo otras condiciones diferentes a las silvestres, a un nivel que es igual o mejor que a las condiciones silvestres, o que son activadas o inactivadas en ciertos microambientes, o que son activadas al transcurrir el tiempo. Además de la temperatura, otras condiciones para las que las proteínas pueden ser evolucionadas u optimizadas incluyen el pH, la presión osmótica, la osmolalidad, la oxidación y la concentración de electrolitos. Otras propiedades deseables que pueden ser optimizadas durante la evolución incluyen la resistencia química y la resistencia proteolítica.

35 Han sido publicadas muchas estrategias para evolucionar o de la ingeniería de moléculas. Sin embargo, la ingeniería o evolución de una proteína para ser inactiva o virtualmente inactiva (menos que el 10% de actividad y especialmente el 1% de actividad) en sus condiciones de operación silvestre, mientras mantiene una actividad equivalente o mejorada respecto a su condición silvestre bajo nuevas condiciones, requiere que las mutaciones desestabilizadoras coexistan con mutaciones que aumentan la actividad, que no contrarrestan el efecto desestabilizante. Se espera que la desestabilización reduzca la actividad de la proteína a un nivel mayor que los efectos predichos por reglas estándar como Q10, por lo que la habilidad de evolucionar proteínas que trabajan eficientemente a temperaturas más bajas, por ejemplo, mientras son inactivas bajo sus condiciones de operación normales, crea una nueva clase de proteínas que denominaremos Proteínas Mirac. N. Palackal et al., "An evolutionary route to xylanase process fitness", Protein Sci. vol. 13, n.º 2, páginas 494-503, 2004 describe una tecnología de evolución dirigida a mejorar selectivamente la estabilidad de una enzima sin comprometer su actividad catalítica. En particular, se usó una xilanasa como ejemplo y se aplicó el uso en tándem de dos estrategias de evolución para hacerla tolerante a temperaturas superiores a 90 °C. Se generó una biblioteca de todas las posibles 19 sustituciones de aminoácidos en cada posición de residuo y se cribó su actividad después de una exposición a la temperatura. Se identificaron nueve cambios de residuos de aminoácidos únicos que mejoraron la termoestabilidad. Se generaron entonces las 512 posibles variantes combinatorias de las nueve mutaciones y se cribaron para una mejor tolerancia térmica en condiciones rigurosas. Solbak et al., "Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric", J. Biol. Chem., vol. 280, n.º 10, páginas 9431-9438, 2005 describe una tecnología Gene Site Saturation Mutagenesis™ para generar una biblioteca. La selección de la biblioteca descubrió 36 mutantes de sitio único que presentaban termotolerancia mejorada. Después, se generó una biblioteca combinatoria derivada de los 12 mutantes de sitio único con mejor rendimiento, utilizando la tecnología Gene Reassembly™. Se produjeron diecinueve variantes con termotolerancia mejorada adicional. El documento de patente WO 2006/031370 describe un método evolutivo que produce polipéptidos que tienen regiones Fc de IgG con modificaciones de aminoácidos, que dan como resultado los polipéptidos que presentan funciones

efectoras de Fc alteradas. Los polipéptidos mutados se criban para una unión de alta afinidad a FcRn a pH 6,0 y presentaron una afinidad de unión más débil a pH 7,4 que a pH 6,0 en comparación con un polipéptido con secuencia nativa. El documento de patente US 2005/0100985 describe un método para producir, a partir de un poli nucleótido modelo parental, un conjunto de poli nucleótidos de progenie mutagenizados donde, en cada posición de

5 codón original, se produce al menos un codón sustituto que codifica cada uno de los 20 aminoácidos codificados de forma natural. También se describe un método para el cribado de polipéptidos híbridos en la solicitud. El documento de patente US 2007/0.009.930 describe un método para producir y aislar un polipéptido que tiene al menos una propiedad deseable. El poli nucleótido de partida se somete a un proceso de mutagénesis y el conjunto de poli nucleótidos de la progenie se somete a un proceso de cribado y enriquecimiento basado en selección final, para

10 seleccionar un subconjunto deseable del conjunto de poli nucleótidos de la progenie. Giver et al. (*"Directed evolution of a thermostable esterase"*, PNAS, vol. 95, pág. 12809-12813, 1998) enseña un método de evolución directa de una esterasa, para identificar un mutante que tiene una temperatura superior de actividad máxima (T<sub>m</sub>) sin comprometer su actividad catalítica a una temperatura más baja. El cribado del mutante se realiza calentando los mutantes a diversas temperaturas y ensayando la actividad catalítica a 30 °C, identificando así que los mutantes tienen una T<sub>m</sub>

15 más alta, lo que dio como resultado un cambio ascendente en la actividad óptima de la temperatura. Lehmann et al. (*"The consensus concept for thermostability engineering of proteins: Further proof of concept"*, Protein Engineering, vol. 15, págs. 403-411, 2002) enseña un método de ingeniería de una proteína para mejorar su termoestabilidad. La ingeniería de proteínas comienza a partir de una fitasa consenso artificial sintética, que está mutada por mutagénesis dirigida al sitio. Los mutantes se criban para determinar mutantes con T<sub>m</sub> aumentada. Se puede usar

20 otra ronda de mutagénesis y cribado para mejorar adicionalmente los mutantes con un aumento adicional de la T<sub>m</sub>. Ossi et al. (*"Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of Trichoderma reesei endo-1,4-[beta]-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH"*, Protein Engineering, vol. 15, páginas/ 141-145, 2002) enseña un método para aumentar el número de Argininas superficiales en la enzima xilanasa, con el fin de aumentar la termoestabilidad de las enzimas mutantes y cambiar su pH óptimo. Las enzimas

25 mutantes se ensayan para determinar su termoestabilidad, cuyo pH óptimo se determinó. Las enzimas mutantes seleccionadas han aumentado la termoestabilidad y aumentado el pH óptimo. Qin et al. (*"Engineering endoglucanase II from Trichoderma reesei to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum"*, J. Biotech., vol. 135, páginas 190-195, 2008) enseña un método de ingeniería de endoglucanasa II para mejorar su actividad catalítica y aumentar su pH óptimo. El método incluye múltiples etapas, dando como resultado cada etapa un

30 aumento adicional en el pH óptimo de los mutantes. La etapa de selección se basa en el criterio de cambiar el pH óptimo de los mutantes a un pH más alto. Fang et al. (*"Protein engineering of Aspergillus awamori glucoamylase to increase its pH optimum"*, Protein Engineering Design and Selection, vol. 11, págs. 383-388, 1998) enseña un método de ingeniería de glucoamilasa para aumentar su pH óptimo. Los mutantes se evalúan midiendo su actividad catalítica a pH en un intervalo de 2,2 a 7,0, identificando, por tanto, mutantes con un pH óptimo aumentado. El

35 documento WO 03/105757 enseña un método para identificar un agente diana dependiente del medio (MDTA) que se une preferiblemente a una microdiana en una diana en comparación con la misma microdiana en una no diana. Una microdiana es típicamente una porción de una molécula diana y un MDTA puede ser un anticuerpo. La referencia describe un proceso de cribado de un scFv mutante, que tiene una unión dependiente de pH a un antígeno. Los mutantes tienen su afinidad de unión al antígeno mayor o menor que el tipo silvestre a ambos pH 6,5 y

40 7.

### **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo condicionalmente activo, el método

45 comprende: seleccionar un anticuerpo silvestre para un antígeno; evolucionar el ADN que codifica el anticuerpo silvestre usando una o más técnicas de evolución para generar un ADN mutante; expresar el ADN mutante para obtener un anticuerpo; someter al anticuerpo mutante y al anticuerpo silvestre a un ensayo bajo una condición fisiológica normal, que está dentro de un intervalo normal de la condición fisiológica en un sitio de administración del anticuerpo condicionalmente activo a un sujeto, o en un tejido u órgano en un sitio de acción del anticuerpo

50 condicionalmente activo de un sujeto, y el ensayo bajo una condición aberrante que se desvía del rango normal de la condición fisiológica en el sitio de administración del anticuerpo condicionalmente activo, o en el tejido u órgano en el sitio de acción del anticuerpo condicionalmente activo, en donde la condición fisiológica normal y la condición aberrante son una misma condición seleccionada de temperatura, pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos; y seleccionar el anticuerpo condicionalmente activo de los anticuerpos mutantes que

55 exhiben tanto (a) una reducción de actividad en el ensayo en las condiciones fisiológicas normales comparado con el anticuerpo silvestre, y (b) un aumento de actividad en el ensayo bajo condiciones aberrantes en comparación con el anticuerpo silvestre. En un aspecto particular, la condición fisiológica normal es la temperatura, en donde la proteína condicionalmente activa es virtualmente inactiva a la temperatura fisiológica normal, pero es activa a una temperatura aberrante menor a la temperatura fisiológica normal. En otros aspectos, el anticuerpo condicionalmente

activo es reversiblemente o irreversiblemente inactivado bajo las condiciones normales silvestres. En un aspecto específico, el anticuerpo es reversiblemente inactivado a las condiciones fisiológicas silvestres.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar modificar la respuesta biológica condicionalmente activa, el método comprende: seleccionar un mediador de respuesta inflamatoria; identificar un anticuerpo silvestre del mediador; evolucionar el anticuerpo silvestre; identificar diferencialmente mutantes que exhiben un acoplamiento disminuido al mediador relacionado al anticuerpo silvestre bajo la primera condición, y que exhiben una afinidad de acoplamiento al mediador aumentado bajo una segunda condición, para identificar supermutantes; y recombinar las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de los supermutantes, para crear supermutantes recombinados; y revisar los supermutantes recombinados para identificar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que exhiba un acoplamiento disminuido al mediador relacionado con el anticuerpo silvestre bajo la primera condición, y que muestran una afinidad aumentada de acoplamiento al mediador bajo la segunda condición, para identificar el modificador de respuesta biológica activa condicionalmente. En un aspecto, el mediador de respuesta inflamatoria es seleccionado de IL-6, receptor de IL-6, TNF-alfa, IL-23 e IL-12. En otro aspecto, las condiciones primera y segunda son seleccionadas de condiciones de pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

20 Para facilitar el entendimiento de los ejemplos que se encuentran en la presente solicitud, serán descritos ciertos métodos y/o términos que ocurren frecuentemente.

El término "agente" es utilizado en la presente solicitud para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos, un arreglo de compuestos espacialmente localizados (por ejemplo, un arreglo de péptido VLSIPS, arreglo poli nucleótido y/o arreglo combinatorio de pequeña molécula), una macromolécula biológica, un péptido bacteriófago de visualización de la biblioteca, un anticuerpo bacteriófago (por ejemplo, scFv) de visualización de la biblioteca, un péptido polisoma de visualización de biblioteca, o un extracto hecho de materiales biológicos tales como células o tejidos de bacteria, plantas, hongos, o de animal (en particular mamífero). Son evaluados agentes para conocer su actividad enzimática potencial, como enzimas terapéuticas biológicas condicionalmente activas, incluyéndolos en ensayos de detección descritos más abajo en la presente solicitud.

Un "requerimiento base ambiguo" en un sitio de restricción, se refiere a un requerimiento base nucleótido que no es especificado en su mayor extensión, es decir, que no es una base específica (como es, de manera ejemplificadora pero no restrictiva, una base específica seleccionada de A, C, G, y T), pero que si no puede ser cualquiera de al menos dos o más bases. Las abreviaciones comúnmente aceptadas que son utilizadas en el estado de la técnica, al igual que en la presente solicitud, para representar ambigüedad en las bases, incluyen las siguientes: R=G o A; Y=C o T; M=A o C; K=G o T; W=A o T; H=A o C o T; B=G o T o C; V=G o C o A; D=G o A o T; N=A o C o G o T.

El término "aminoácido" utilizado en la presente solicitud se refiere a cualquier compuesto orgánico que contiene un grupo amino (--NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (--COOH); preferentemente en la forma de grupos libres o alternativamente luego de condensarse como parte de uniones peptídicas. Los "veinte alfa-aminoácidos, naturalmente codificados, que forman polipéptidos" son entendidos en el estado de la técnica y se refieren a: alanina (ala o A), arginina (arg o R), aspargina (asn o N), ácido aspártico (asp o D), cisteína (cys o C), ácido glutámico (glu o E), glutamina (gln o Q), glicina (gly o G), histidina (his o H), isoleucina (ile o I), leucina (leu o L), lisina (lys o K), metionina (met o M), fenilalanina (phe o F), prolina (pro o P), serina (ser o S), treonina (thr o T), triptófano (trp o W), tirosina (tyr o Y), y valina (val o V).

El término "amplificación" significa que el número de copias de un poli nucleótido se encuentra aumentado.

Una molécula que tiene una "propiedad quimérica" es una molécula que es: 1) en parte homóloga y en parte heteróloga, a una primera molécula de referencia; mientras que 2), al mismo tiempo, es en parte homóloga y en parte heteróloga a una segunda molécula de referencia; sin 3) excluir la posibilidad de ser, al mismo tiempo, en parte homóloga y en parte heteróloga a aún una o más moléculas adicionales de referencia. En una modalidad no limitante, una molécula quimérica puede ser preparada ensamblando un reordenamiento de secuencias moleculares parciales. En un aspecto no limitante, una molécula quimérica poli nucleótida puede ser preparada sintetizando el poli nucleótido quimérico usando una pluralidad de plantillas moleculares, de forma tal de que el poli nucleótido quimérico resultante tenga propiedades de una pluralidad de plantillas.

El término "cognado" utilizado en la presente solicitud, se refiere a una secuencia genética que es evolutivamente y

funcionalmente relacionada entre especies. Por ejemplo, pero no limitante, en el genoma humano el gen CD4 humano es el gen cognado al gen 3d4 de ratón, debido a que las secuencias y estructuras de ambos genes indican que son altamente homólogas y ambos genes codifican una proteína que funciona señalizando la activación de células T a través del reconocimiento de antígeno MHC restringido de clase II.

5

Una “ventana de comparación”, utilizado en la presente solicitud, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos, en donde una secuencia poli nucleótido puede ser comparada con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos, y en donde la porción de la secuencia poli nucleótido en la ventana de comparación, puede comprender adiciones o supresiones (es decir, vacíos) de 20 por ciento o menos, en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones), para la alineación óptima de ambas secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación, puede ser conducida por el algoritmo de homología local de Smith (Smith and Waterman, 1981, “*Comparison of biosequences*”, *Adv Appl Math*, 2:482-489; Smith y Waterman, 1981, “*Overlapping genes and information theory*”, *J Theor Biol*, 91:379-380; Smith y Waterman, *J Mol Biol*, “*Identification of common molecular subsequences*”, 1981, 147:195-197; Smith et al., 1981, “*Comparative biosequence metrics*”, *J Mol Evol*, 18:38-46), por el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman (Needleman y Wunsch, 1970, “*A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins*” *J Mol Biol*, 48(3):443-453), por la búsqueda de similitud de Pearson (Pearson y Lipman, 1988, “*Improved tools for biological sequence comparison*”, *pro Nat Acad Sci USA*, 85:2444-2448), por implementaciones computacionales de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en la Winsconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección, y es seleccionado el mejor alineamiento (es decir, resultante en el porcentaje más alto de homología a lo largo de la ventana de comparación) generado por los variados métodos.

El término “anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo” se refiere a una variante, o mutante, de un anticuerpo silvestre que es más o menos activo que el anticuerpo silvestre parental bajo una o más condiciones fisiológicas normales. Este anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo también exhibe actividad en regiones seleccionadas del cuerpo y/o exhibe actividad aumentada o reducida bajo condiciones fisiológicas aberrantes, o permisivas. Las condiciones fisiológicas normales son aquellas de temperatura, pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos que se considerarían dentro de un rango normal en el sitio de administración, o en el tejido u órgano en el sitio de acción, en un sujeto. Una condición aberrante es aquella que desvía del rango normalmente aceptable para dicha condición. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo se encuentra virtualmente inactivo en condiciones fisiológicas normales, pero se encuentra activo en condiciones fuera de aquellas fisiológicas normales, a un nivel que es igual o mejor que bajo condiciones fisiológicas normales. Por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo evolucionado, es virtualmente inactivo a temperatura corporal, pero es activo a temperaturas más bajas. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, es reversiblemente o irreversiblemente inactivado bajo las condiciones fisiológicas normales. En otro aspecto, el anticuerpo silvestre es una proteína terapéutica. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, es utilizado como un fármaco, o un agente terapéutico. En otro aspecto más, el anticuerpo es más o menos activo en sangre altamente oxigenada, tal como, por ejemplo, después de pasar por los pulmones o en los ambientes de pH más bajo que se encuentran en el riñón.

“Sustituciones conservadoras de aminoácidos” se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, son glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilas, son serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida, son asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas, son fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas, son lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadena laterales que contienen azufre, son cisteína y metionina. Grupos de sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

El término “corresponde a” se utiliza en la presente solicitud para significar que una secuencia poli nucleótido es homóloga (es decir, es idéntica, no relacionada estrictamente de forma evolucionaria) a todas o a parte de una secuencia poli nucleótido de referencia, o que una secuencia polipéptido es idéntica a una secuencia polipéptido de referencia. En contraposición, el término “complementario a” es utilizado en la presente solicitud para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una porción de una secuencia poli nucleótido de referencia. Por ilustrar, la secuencia nucleótida “TATAC” corresponde a una referencia “TATAC” y es complementaria a una secuencia “GTATA” de referencia.

El término cantidad “efectivamente degradante” se refiere a la cantidad de enzima que es necesaria para procesar al menos el 50% del sustrato, en comparación con el sustrato que no se encuentra en contacto con la enzima.

- 5 Como es utilizado en la presente solicitud, el término “marco definido de secuencia” se refiere a un juego de secuencias definidas que son seleccionadas con una base no aleatoria, generalmente en base de datos experimentales o datos estructurales; por ejemplo, un marco definido de secuencia puede comprender un juego de secuencias de aminoácidos que son predichos para formar una estructura de hoja-beta o puede comprender un motivo repetido de cremallera de siete leucinas, un dominio de zinc de tipo dedo, entre otras variaciones. Una
- 10 “secuencia palmiste definida” es un juego de secuencias que engloban un grado de variabilidad limitado. En cambio (1) una secuencia completamente aleatoria de 10-mer de los 20 aminoácidos convencionales puede ser cualquiera de (20)<sup>10</sup> secuencias, y (2) una secuencia pseudo-aleatoria 10-mer de los 20 aminoácidos convencionales pueden ser cualquiera de (20)<sup>10</sup> secuencias pero exhibirán un sesgo para ciertos residuos en ciertas posiciones y/o general, (3)
- 15 una secuencia palmiste definida es un subjuego de secuencias si cada posición residual pudiese ser cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales permitidos (y/o amino/iminoácidos no convencionales permitidos). Una secuencia palmiste definida generalmente, comprende posiciones de residuos variantes e invariantes y/o comprende posiciones de residuos variantes que pueden comprender un residuo seleccionado de un subjuego definido de residuos de aminoácido, y similares, de manera segmentada o a lo largo del largo entero de la secuencia de biblioteca seleccionada individualmente. Secuencias de palmiste definidas se pueden referir a secuencias de
- 20 aminoácido o poli nucleótidos. Con la finalidad de ilustrar y no limitar, las secuencias (NNK)<sub>10</sub> y (NNM)<sub>10</sub>, en donde N representa A, T, G, o C; K representa G o T; y M representa A o C, son secuencias palmiste definidas.

- “Digestión” de ADN se refiere a grietas catalíticas del ADN con una enzima de restricción que actúa sólo a ciertas secuencias en el ADN. Las diversas enzimas de restricción utilizadas en la presente solicitud se encuentran
- 25 comercialmente disponibles y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requerimientos fueron utilizados en la forma que es conocida para un experto en la materia. Para propósitos analíticos, típicamente 1 microgramo de plásmido o fragmento de ADN es utilizado con, aproximadamente, 2 unidades de enzima en, aproximadamente, 20 micro litros de solución buffer. Para el propósito de aislar fragmentos de ADN para la construcción de plásmidos, típicamente de 5 a 50 microgramos de ADN, son digeridos con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor.
- 30 Los buffers apropiados y cantidades de sustrato para enzimas de restricción particulares, son especificados por el fabricante. Se utilizan comúnmente tiempos de incubación de, aproximadamente, 1 hora a 37 grados Celsius, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Luego de la digestión, la reacción es electroforada directamente en un gel para aislar el fragmento deseado.

- 35 “Ligadura direccional” se refiere a una ligadura en que un extremo 5’ y un extremo 3’ de un poli nucleótido son suficientemente diferentes como para especificar la dirección de la ligadura. Por ejemplo, un producto PCR de lo contrario no tratado y no digerido que tiene dos puntas embotadas típicamente, no tendrá una dirección de ligadura preferida cuando se encuentre ligado con un vector de clonación, digerido para producir puntas embotadas en su sitio múltiple de clonación; de ésta manera, la ligadura direccional típicamente no sería mostrada bajo éstas
- 40 circunstancias. Por otra parte, la ligadura direccional típicamente será mostrada cuando un producto PCR que tiene un extremo 5’ tratado con EcoR I y uno 3’ BamH I, es ligado a un vector de clonación que tiene un sitio de clonación múltiple digerido con EcoR I y BamH I.

- El término “transposición de ADN” es utilizado en la presente solicitud para indicar la recombinación entre
- 45 secuencias sustancialmente homólogas, pero no idénticas, en algunas modalidades la transposición de ADN puede involucrar entrecruzamiento vía recombinación no homóloga, tal como vía sistemas cer/lox y/o flp/frt y similares. La transposición de ADN puede ser aleatoria o no aleatoria.

- El término “fármaco” o “molécula de fármaco” se refiere a un agente terapéutico que incluye una sustancia que tiene
- 50 un efecto benéfico, en un cuerpo humano o animal cuando es administrado al cuerpo humano o animal. Preferentemente, el agente terapéutico incluye una sustancia que puede tratar, curar o aliviar uno o más síntomas, enfermedades o condiciones anormales en un cuerpo humano o animal, o aumentar la mejoría de un cuerpo humano o animal.

- 55 Una “cantidad efectiva” es una cantidad de una proteína o fragmento de proteína biológica condicionalmente activa, que es efectiva para tratar o prevenir una condición en un organismo vivo a quien es administrado a lo largo de un periodo de tiempo, por ejemplo, proporciona un efecto terapéutico durante un intervalo de dosis deseado.

Como es utilizado en la presente solicitud, el término “electrolito” es utilizado para definir un mineral en la sangre u

otros fluidos corporales que llevan una carga. Por ejemplo, en un aspecto de la invención, la condición fisiológica normal y la condición aberrante pueden ser condiciones de "concentración de electrolitos". En un aspecto, la concentración de electrolitos a ser medidos es seleccionada de la concentración de uno o más de calcio, sodio, potasio, magnesio, cloro, bicarbonato y fosfato ionizado. Por ejemplo, en un aspecto, el rango normal de calcio de suero es de 8,5 a 10,2 mg/dL. En este aspecto, la concentración aberrante de calcio de suero puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal. En otro ejemplo, en un aspecto, el rango normal de cloruro en suero es de 96 a 106 miliequivalentes por litro (mEq/L). En este aspecto, la concentración aberrante de cloruro en suero puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal. En otro ejemplo, en un aspecto, el rango normal de magnesio en suero es de 1,7 a 2,2 mg/dL. En este aspecto, la concentración aberrante de magnesio en suero puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal. En otro ejemplo, en un aspecto, el rango normal de fósforo en suero es de 2,4 a 4,1 mg/dL. En este aspecto, la concentración aberrante de fósforo en suero puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal. En otro ejemplo, en un aspecto, el rango normal de sodio en suero, o sangre, es de 135 a 145 mEq/L. En este aspecto, la concentración aberrante de sodio en suero, o sangre, puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal. En otro ejemplo, en un aspecto, el rango normal de potasio en suero, o sangre, es de 3,7 a 5,2 mEq/L. En este aspecto, la concentración aberrante de potasio en suero, o sangre, puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal. En un aspecto adicional, el rango normal de bicarbonato en suero, o sangre, es de 20 a 29 mEq/L. En este aspecto, la concentración aberrante de bicarbonato en suero, o sangre, puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal. En un aspecto diferente, los niveles de bicarbonato pueden ser utilizados para indicar los niveles normales de acidez (pH) en la sangre. El término "concentración de electrolitos" también puede ser utilizado para definir la condición de un electrolito, en particular en un fluido corporal o en un tejido, distinto de sangre o plasma. En este caso, la condición fisiológica normal es considerada como el rango clínico normal para dicho tejido o fluido. En este aspecto, la concentración aberrante de electrolito de tejido o fluido puede ser seleccionada de sobre o bajo el rango normal.

Como es utilizado en la presente divulgación de la invención, el término "epitopo" se refiere a un antígeno, tal como una enzima polipéptido, al cual se une el paratopo de un anticuerpo, tal como un anticuerpo enzima-específica. Los antígenos determinantes usualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie, químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, como también características de carga específicas. Como es utilizado en la presente solicitud "epitope" se refiere a aquella porción de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interactúa con la región variable del cuerpo de unión de un anticuerpo. Típicamente, dicha interacción de unión es manifestada como un contacto intramolecular con uno o más residuos de aminoácido de un CDR.

Como es utilizada en la presente solicitud, una "enzima" es una proteína con propiedades catalíticas específicas. Pueden afectar la velocidad de catálisis factores tales como, por ejemplo, concentración de sustrato, pH, temperatura y presencia o ausencia de inhibidores. Típicamente, para una enzima silvestre, Q10 (el coeficiente de temperatura) describe el aumento en la tasa de reacción con un aumento de 10 grados Celsius en la temperatura. Para enzimas silvestre, la  $Q_{10} = 2$  a  $3$ , en otras palabras, la tasa de reacción se duplica o triplica con cada aumento de 10 grados en la temperatura. A altas temperaturas, las proteínas se desnaturalizan. A valores de pH ligeramente diferentes del valor óptimo de una enzima, pequeños cambios ocurren en las cargas de la enzima y, posiblemente, en la molécula sustrato. El cambio en ionización puede afectar a la unión de la molécula sustrato. A niveles de pH extremo, la enzima produce desnaturalización, en donde el sitio activo es distorsionado, y la molécula sustrato ya no cabrá.

Como es utilizado en la presente solicitud, el término "evolución" o "evolucionando", se refiere a usar uno o más métodos de mutagénesis para generar un poli nucleótido novedoso, que codifica un polipéptido novedoso; dicho polipéptido novedoso es por si solo una molécula biológica mejorada y/o contribuye a la generación de otra molécula biológica mejorada. En un aspecto particular, pero no limitante, la presente invención se relaciona con la evolución de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos, a partir de un anticuerpo silvestre parental. En un aspecto, por ejemplo, evolución se relaciona con un método para realizar tanto quimerización de poli nucleótido no estocástica y mutagénesis puntual no estocástica sitio-dirigida, divulgados en la publicación de solicitud de patente U.S. 2009/0130718.

Los términos "fragmento", "derivado" y "análogo" cuando se refieren a un polipéptido de referencia, comprenden un polipéptido que retiene, al menos, una función o actividad biológica, que es, al menos, esencialmente la misma que la del polipéptido de referencia. Además, los términos "fragmento", "derivado" o "análogo", son ejemplificados por una molécula "pro-forma", tal como una proproteína de baja actividad, que puede ser modificada por clivaje para producir una enzima madura con actividad significativamente más alta.

Se proporciona en la presente solicitud un método para producir de una guía polipéptido, un juego de polipéptidos de progenie, en que un “rango completo de sustituciones de aminoácido únicas” es representado en cada posición de aminoácido. Como es usado en la presente solicitud, “rango completo de sustituciones de aminoácido únicas” es en referencia a los 20 aminoácidos-alfa naturalmente codificadas que forman polipéptidos, en la forma en que se describe en la presente solicitud.

El término “gen” significa el segmento de ADN involucrado en la producción de una cadena de polipéptido; incluye regiones que preceden y siguen la región codificadora (líder y seguidor), al igual que las secuencias que intervienen (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

“Inestabilidad genética”, como es utilizada en la presente solicitud, se refiere a la tendencia natural de secuencias altamente repetitivas de ser perdidas a lo largo de un proceso de eventos reductivos, que generalmente involucran la simplificación de secuencia a través de la pérdida de secuencias repetidas. Las eliminaciones tienden a involucrar la pérdida de una copia de una repetición y todo entre las repeticiones.

El término “heterólogo” significa que una secuencia de ácido nucleico de hebra única es incapaz de hibridar a otra secuencia de ácido nucleico de una hebra o su complemento. De ésta manera áreas de heterología significan que áreas de poli nucleótidos o poli nucleótidos tienen áreas o regiones dentro de su secuencia que son incapaces de hibridar en otro ácido nucleico o poli nucleótido. Dichas regiones o áreas son, por ejemplo, áreas de mutaciones.

El término “homólogo” o “homeólogo” significa que una secuencia de ácido nucleico de hebra única puede hibridar a una secuencia de ácido nucleico de hebra única. El grado de hibridación puede depender de un número de factores que incluyen la cantidad de identidad entre las secuencias y las condiciones de hibridación, tales como la temperatura y concentración de sales, como es discutido más abajo. Preferentemente, la región de identidad es mayor que, aproximadamente, 5 bp, más preferentemente, la región de identidad es mayor que 10 bp.

Los beneficios de ésta invención se extienden a “aplicaciones industriales” (o procesos industriales), cuyo término es utilizado para incluir aplicaciones en la industria comercial adecuada (o la industria simple), así como aplicaciones industriales no comerciales (por ejemplo, investigación biomédica en una institución sin fines de lucro). Las aplicaciones relevantes incluyen aquellas en las áreas de diagnóstico, medicina, agricultura, manufactura, y academia.

El término “idéntico” o “identidad” significan que dos secuencias de ácido nucleico tienen la misma secuencia o una secuencia complementaria. De ésta manera, “áreas de identidad” significa que regiones o áreas de un poli nucleótido o el poli nucleótido, en general, son idénticos o complementarios a áreas de otro poli nucleótido.

El término “aislado” significa que el material es removido de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si ocurre naturalmente). Por ejemplo, un poli nucleótido o una enzima que ocurre naturalmente, presente en un animal vivo, no se encuentra aislado, pero el mismo poli nucleótido o enzima, separado de una parte o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, es aislado. Dichos poli nucleótidos pueden ser parte de un vector y/o dichos poli nucleótidos o enzimas podrían ser parte de una composición y, aun así, ser aislado en que dicho vector o composición no es parte de su ambiente natural.

El término “ácido nucleico aislado” es utilizado para definir un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN, que no es inmediatamente contigua a las secuencias laterales 5' y 3', con que normalmente es inmediatamente contigua, cuando se encuentra en el genoma de ocurrencia natural del organismo del cual es derivado. De esta manera este término describe, por ejemplo, un ácido nucleico que es incorporado en un vector, tal como un plásmido o vector viral; un ácido nucleico que es incorporado en el genoma de una célula heteróloga (o el genoma de una célula homóloga, pero en un sitio diferente a la que naturalmente ocurre); y un ácido nucleico que existe como una molécula separada, por ejemplo, un fragmento de ADN producido por amplificación PCR o digestión de enzima restrictiva, o una molécula RNA producida por transcripción in vitro. El término también describe un ácido nucleico recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipéptido adicional, que puede ser utilizado, por ejemplo, en la producción de una proteína de fusión.

Como es utilizado “ligando” se refiere a una molécula, tal como un péptido aleatorio o un segmento de secuencia variable, que es reconocido por un receptor específico. Como una persona versada en la materia reconocería, una molécula (o macromolécula compleja) puede ser tanto un receptor y un ligando. En general, la pareja de unión que tiene un peso molecular menor, es referido como el ligando, y la pareja de unión que tiene un peso molecular mayor, es referido como el receptor.

“Ligazón” se refiere al proceso de formar enlaces de fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de hebra doble (Sambrook et al., (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., p. 146; Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A menos que se provea de lo contrario, la ligazón puede ser lograda utilizando buffers conocidas con 10 unidades de ligase de ADN T4 (“ligasa”) por 0,5 microgramos de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a ser ligadas.

Como es utilizado en la presente invención, “enlazador” o “espaciador” se refiere a una molécula o grupo de moléculas que conectan dos moléculas, tales como una proteína de unión a ADN y un péptido aleatorio, y sirve para colocar las dos moléculas en una configuración preferida, por ejemplo, para que el péptido aleatorio se pueda unir a un receptor, con mínimo impedimento estérico por parte de la proteína de unión a ADN.

Como es utilizado en la presente solicitud “microambiente” significa cualquier porción o región de un tejido o cuerpo que tiene diferencias constantes o temporales, físicas o químicas con otras regiones del tejido o regiones del cuerpo.

Como es utilizado en la presente solicitud, una “propiedad molecular a ser evolucionada”, incluyen la referencia a moléculas comprendidas por una secuencia polinucleótida, moléculas comprendidas por una secuencia polipéptido, y moléculas comprendidas en parte de una secuencia poli nucleótido y en parte de una secuencia polipéptido. Ejemplos, particularmente relevantes—pero sin ningún motivo limitante—, de propiedades moleculares a ser evolucionadas, incluyen actividades de proteína bajo condiciones específicas, tales como relacionadas a temperatura, salinidad, presión osmótica, pH, oxidación y concentración de glicerol, DMSO, detergente y/o cualquier otra especie molecular con que haya contacto en un ambiente de reacción. Adicionalmente, ejemplos de propiedades moleculares a ser evolucionadas, particularmente relevantes—pero por ningún motivo limitante—, incluyen estabilidades, por ejemplo, la cantidad de una propiedad molecular residual que se encuentra presente después de un tiempo específico de exposición a un ambiente especificado, tal como se puede encontrar durante su almacenamiento.

El término “mutaciones” significa cambios en la secuencia de una secuencia de ácido nucleico silvestre o cambios en la secuencia de un péptido. Dichas mutaciones pueden ser mutaciones puntuales, tales como transiciones o transversiones. Las mutaciones pueden ser eliminaciones, inserciones o duplicaciones.

Como es utilizado en la presente solicitud, la secuencia degenerada “N,N,G/T” representa 32 posibles tripletes, en donde “N” puede ser A,C,G o T.

El término “naturalmente ocurrente” utilizado en la presente solicitud, como es aplicado al objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o poli nucleótido que se encuentra presente en un organismo (incluyendo un virus), que puede ser aislada de una fuente en la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificada por el hombre en el laboratorio, es naturalmente ocurrente. Generalmente, el término naturalmente ocurrente se refiere a un objeto, como se presente en un individuo no patológico (sin enfermedad), tal como sería típico para la especie.

Como es utilizado en la presente solicitud, “condiciones fisiológicas normales” o “condiciones de operación silvestres”, son aquellas condiciones de temperatura, pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos que se considerarían dentro de un rango normal en el sitio de administración o el sitio de acción, en un sujeto.

Como es utilizado en la presente solicitud, una “molécula de ácido nucleico” se encuentra comprendida por al menos una base o un par base, dependiendo de si es de hebra única o hebra doble, respectivamente. Además, una molécula de ácido nucleico puede pertenecer exclusivamente o quiméricamente a cualquier grupo de moléculas que contienen nucleótidos, como es ejemplificado por, pero no limitado a, los siguientes grupos de moléculas de ácido nucleico: ARN, ADN, ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos no genómicos, ácidos nucleicos que ocurren naturalmente y no naturalmente. Esto incluye, como un ejemplo no limitante, ácidos nucleicos asociados con cualquier organelo, tal como la mitocondria, ARN ribosomal, y moléculas de ácido nucleico comprendidas quiméricamente de uno o más componentes que son ocurrentes no naturalmente junto con componentes que ocurren naturalmente.

Adicionalmente, una “molécula de ácido nucleico” puede contener en parte uno o más componentes no basados en nucleótidos, como es ejemplificado por, pero no limitado a, aminoácidos y azúcares. De ésta manera, como ejemplo,

pero no limitante, un ribosoma, que es en parte basado en nucleótidos y en parte basado en proteínas, es considerado una “molécula de ácido nucleico”.

Además, como ejemplo, pero no limitante, una molécula de ácido nucleico que es trazado con una porción detectable, tal como es un radioactivo o, alternativamente, una traza no radioactiva, es igualmente considerada una “molécula de ácido nucleico”.

Los términos “secuencia de ácido nucleico que codifica para” o una “secuencia codificadora de ADN de” o una “secuencia de nucleótidos que codifica” una enzima particular —como también otros términos sinónimos— se refieren a una secuencia de ADN que es transcrita y traducida a una enzima, cuando es colocada bajo el control de secuencias regulatorias apropiadas. Una “secuencia promotora” es una región regulatoria de ADN capaz de unir polimerasa de ARN en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación desde el origen (dirección 3'). La secuencia promotora incluye el número mínimo de bases, donde haya elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables sobre el trasfondo. Sin embargo, luego de que la polimerasa de ARN se une a la secuencia y la transcripción es iniciada en el codón de inicio (terminal 3' con un promotor), la transcripción procede desde el origen en la dirección 3'. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de transcripción (convenientemente definida por mapeo con S1 nucleasa), como también dominios de unión de proteína (secuencias consensas) responsables de la unión de polimerasa de ARN.

Los términos “ácido nucleico que codifica una enzima (proteína)” o “ADN que codifica una enzima (proteína)” o “poli nucleótido que codifica una enzima (proteína)” y otros términos sinónimos, abarcan un poli nucleótido que incluye únicamente secuencia de codificación para la enzima, como también un poli nucleótido que incluye secuencia adicional de codificación o no codificadora.

En una modalidad preferida, una “especie de molécula de ácido nucleico” es definida por su estructura química, como es ejemplificado por, pero no limitado a, su secuencia primaria. En otra modalidad preferida, una “especie de molécula de ácido nucleico” es definida por una función de la especie de ácido nucleico o por una función de un producto derivado de la especie de ácido nucleico. De ésta manera, como ejemplo no limitante, una “especie de molécula de ácido nucleico” puede ser definida por una o más actividades o propiedades atribuibles a la misma, incluyendo actividades o propiedades atribuibles a su producto de expresión.

La definición instantánea de “armar una muestra funcional de ácido nucleico en una biblioteca de ácido nucleico” incluye el proceso de incorporar una muestra de ácido nucleico en una colección basada en un vector, tal como por ligazón, en un vector y transformación de un huésped. Una descripción de vectores relevantes, huéspedes, y otros re-agentes, como también ejemplos específicos no limitantes, se presentan más abajo. La definición instantánea de armar una muestra funcional de ácido nucleico en una biblioteca de ácido nucleico” también incluye el proceso de incorporar una muestra de ácido nucleico en una colección no basada en vectores, tal como por ligazón a adaptores. Preferentemente, los adaptores pueden fortalecer cebadores para facilitar amplificación por PCR.

Acordemente, en una modalidad no limitante, una “biblioteca de ácido nucleico” se encuentra comprendida por una colección a base de vectores de una o más moléculas de ácido nucleico. En otra modalidad preferida una “biblioteca de ácido nucleico” se encuentra comprendida por una colección a no basada en vectores, de moléculas de ácido nucleico. En otra modalidad preferida más, una “biblioteca de ácido nucleico” se encuentra comprendida por una colección combinada de moléculas de ácido nucleico que es en parte basado en vectores y en parte no basado en vectores. Preferentemente, la colección de moléculas que comprenden una biblioteca es capaz de ser buscada y separable de acuerdo con especies individuales de moléculas de ácido nucleico.

La presente invención proporciona una “construcción de ácido nucleico” o, alternativamente, una “construcción de nucleótido” o, alternativamente, una “construcción de ADN”. El término “construcción” es utilizado en la presente solicitud para describir una molécula, tal como un poli nucleótido (por ejemplo, un poli nucleótido de enzima) que, opcionalmente, puede ser unida a una o más porciones moleculares adicionales, tal como un vector, o parte de un vector. En un aspecto específico —pero por ningún motivo limitante—, una construcción de nucleótido es ejemplificado por construcciones de expresión de ADN adecuados para la transformación de una célula huésped.

Un “oligonucleótido” (o sinónimamente, un “oligo”) se refiere a un polideoxinucleótido de hebra única o dos hebras complementarias de polideoxinucleótidos que pueden ser químicamente sintetizados. Dichos oligonucleótidos sintéticos pueden o no tener un fosfato 5'. Aquellos que no tienen no se ligarán a otro oligonucleótido sin agregar un fosfato con un ATP en la presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se ligará a un fragmento que no ha sido desfosforilado. Para lograr amplificación basada en polimerasa (tal como con PCR), un “oligonucleótido

veces degenerado que es comprendido por, en serie, al menos una primera secuencia homóloga, una secuencia degenerada N,N,G/T y una segunda secuencia homóloga” es mencionada. Como es utilizado en este contexto, “homólogo” es en referencia a homología entre el oligo y el poli nucleótido parental que es sometido a la amplificación basada en polimerasa.

5

Como es utilizado en la presente solicitud, el término “enlazado de manera operativa” se refiere al enlazamiento de elementos poli nucleótidos en una relación funcional. Un ácido nucleico es “enlazado de manera operativa” cuando es colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador es enlazado de manera operativa a una secuencia que codifica si afecta la transcripción de la secuencia que

10

codifica. Enlazado de manera operativa significa que las secuencias de ADN a ser enlazadas son típicamente contiguas y, donde es necesario unir dos regiones codificadoras de proteína, contiguas y en un marco de lectura.

Una secuencia codificadora es “enlazada de manera operativa a” otra secuencia codificadora cuando la polimerasa de ARN transcribirá las dos secuencias codificadoras en un único ARNm, que es luego traducido en un único

15

polipéptido que tiene aminoácidos derivados de ambas secuencias codificadoras. Las secuencias codificadoras no necesitan ser contiguas una a otra, mientras las secuencias expresadas son procesadas en última instancia para producir la proteína deseada.

Como es utilizado en la presente solicitud, el término “juego parental de poli nucleótidos” es un juego comprendido

20

por una o más especies de poli nucleótidos distintos. Usualmente, este término es utilizado en referencia a un juego progenie de poli nucleótidos que es, preferentemente, obtenido por mutagenización del juego parental, en donde los términos “parental”, “generador” y “plantilla” son utilizados de manera intercambiable.

El término “paciente” o “sujeto”, se refiere a un animal, por ejemplo, un mamífero, tal como un humano, que es objeto

25

de tratamiento. El sujeto o paciente, puede ser masculino o femenino.

Como es utilizado en la presente solicitud, el término “condiciones fisiológicas” se refiere a temperatura, pH, presión osmótica, fuerza iónica, viscosidad, y como parámetros bioquímicos que son compatibles con un organismo viable, y/o que típicamente existen intracelularmente en una célula de levadura o célula mamífera viable en cultivo. Por

30

ejemplo, las condiciones intracelulares en una célula de levadura cultivada bajo condiciones de cultivo típicas de laboratorio, son condiciones fisiológicas. Condiciones de reacción in vitro adecuadas para mezclas para transcripción in vitro, son generalmente condiciones fisiológicas. En general, condiciones fisiológicas comprenden 50-200 mM NaCl o KCl, pH 6,5-8,5, 20-45 grados Celsius y 0,001-10 mM de catión divalente (por ejemplo, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>); preferentemente, aproximadamente, 150 mM NaCl o KCl, pH 7,2-7,6, 5 mM de catión divalente, y, a veces, incluye 0,01-1,0 por ciento de proteína no específica (por ejemplo, BSA). Un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton X-100) puede estar presente a veces, usualmente en un 0,001 a 2%, típicamente en un 0,05-0,2% (v/v). las condiciones acuosas particulares pueden ser seleccionadas por el practicante, de acuerdo a métodos convencionales. Como guía general, las siguientes condiciones acuosas neutralizadas puede ser aplicables: 10-250

35

mM NaCl, 5-50 mM Tris HCl, pH 5-8, con la adición opcional de cationes divalentes y/o quelantes de metal y/o

40

detergentes no iónicos y/o fracciones de membrana y/o agentes antiespumantes y/o centellantes. Condiciones fisiológicas normales se refiere a condiciones de temperatura, pH, presión osmótica, osmolaridad, oxidación y concentración de electrolitos, in vivo en un paciente o sujeto en el sitio de administración o el sitio de acción, que se considerarían dentro del rango normal en un paciente.

45

Convención estándar (5' a 3') es utilizado en la presente solicitud para describir la secuencia de poli nucleótidos de doble hebra.

El término “población” como es utilizado en la presente solicitud significa una colección de componentes, tales como poli nucleótidos, porciones o poli nucleótidos o proteínas. Una “población mezclada” significa una colección de

50

componentes que pertenecen a la misma familia de ácidos nucleicos o proteínas (es decir son relacionados), pero que difieren en su secuencia (es decir, no son idénticos) y, por lo tanto, en su actividad biológica.

Una molécula que tiene una “proforma” se refiere a una molécula que sufre de cualquier combinación de una o más modificaciones químicas covalentes y no covalentes (por ejemplo, glicosilación, clivaje proteolítico, dimerización u oligomerización, cambio conformacional inducido por temperatura o inducido por pH, asociación con un cofactor, etc.), en camino a alcanzar una forma molecular más madura, que tiene una diferencia de propiedad (por ejemplo, un aumento en actividad) en comparación con la molécula proforma de referencia. Cuando dos o más modificaciones químicas (por ejemplo, dos clivajes proteolíticos, o un clivaje proteolítico y una desglicosilación) pueden ser distinguidas en vía a la producción de una molécula madura, la molécula precursora de referencia puede

55

ser denominada molécula “pre-proforma”.

Como es utilizado en la presente solicitud, el término “seudoaleatorio” se refiere a un juego de secuencias que tienen variabilidad limitada, de forma tal como, por ejemplo, el grado de variabilidad de residuo en otra posición, pero en cualquier posición seudoaleatorio es permitido un grado de variación de residuo, sin importar su circunscripción.

“Unidades cuasi-repetidas”, como es utilizado en la presente solicitud, se refiere a las repeticiones al ser reordenados y que son por definición, no idénticas. De hecho, el método se propone no solo para unidades codificadoras prácticamente idénticas producidas por mutagénesis de la secuencia inicial idéntica, sino también para el reordenamiento de secuencias similares o relacionadas, que pueden divergir significativamente en algunas regiones. Sin embargo, si las secuencias contienen suficientes homologías para ser reafirmadas por éste apronte, pueden ser referidas como unidades “cuasi-repetidas”.

Como es utilizado en la presente solicitud, “biblioteca aleatoria de péptidos” se refiere a un juego de secuencias de poli nucleótidos que codifican un juego de péptidos aleatorios, y al juego de péptidos aleatorios codificados por dichas secuencias de poli nucleótidos, así como a las proteínas de fusión que contienen dichos péptidos aleatorios.

Como es utilizado en la presente solicitud, “secuencia aleatoria de péptidos” se refiere a una secuencia de aminoácidos compuesta por dos o más monómeros de aminoácidos y construida por un proceso estocástico o aleatorio. Un péptido aleatorio puede incluir motivos de estructura o marco, que pueden comprender secuencias invariantes.

Como es utilizado en la presente solicitud, “receptor” se refiere a una molécula que tiene una afinidad por un ligando dado. Los receptores pueden ser moléculas naturalmente ocurrentes o sintéticas. Los receptores pueden ser utilizados en un estado inalterado o como agregados con otras especies. Los receptores pueden ser unidos, covalentemente o no covalentemente, a un miembro de unión, directamente o por medio de una sustancia específica de unión. Ejemplos de receptores incluyen, pero no son limitados a, anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y antisuero reactivo con determinantes antigénicos específicos (tales como sobre virus, células, u otros materiales), receptores de membrana celulares, carbohidratos complejos y glicoproteínas, enzimas, y receptores de hormona.

Enzimas “recombinantes” se refiere a enzimas producidas por técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas de células transformadas por una construcción de ADN exógeno que codifica la enzima deseada. Enzimas “sintéticas” son aquellas preparadas por síntesis química.

El término “poli nucleótidos relacionados” significa que regiones o áreas de los poli nucleótidos son idénticas y regiones o áreas de los poli nucleótidos son heterólogas.

“Reordenamiento reductivo”, como es utilizado en la presente solicitud, se refiere al aumento en diversidad molecular que es acumulado por medio de eventos de eliminación (y/o inserción) que son mediados por secuencias repetidas.

Los siguientes términos son utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más poli nucleótidos: “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia”, e “identidad sustancial”.

Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida, usada como base para una comparación de secuencia; una secuencia de referencia puede ser un subjuego de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de largo completo o una secuencia de gen dada en un listado de secuencias, o puede comprender un ADNc completo o secuencia de gen. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 20 nucleótidos de largo, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de largo, y, a veces, al menos 50 nucleótidos de largo. Debido a que dos poli nucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa de poli nucleótido) que es similar entre ambos poli nucleótidos y (2) puede, además, comprender una secuencia que es divergente entre ambos poli nucleótidos, son típicamente realizadas comparaciones de secuencia entre dos (o más) poli nucleótidos, comparando secuencias de ambos poli nucleótidos en una “ventana de comparación”, para identificar y comparar regiones locales de similitud secuencial.

“Índice repetitivo (RI)”, como es utilizado en la presente solicitud, es el número promedio de copias de las unidades cuasi-repetidas contenidas en el vector de clonación.

El término "sitio de restricción" se refiere a una secuencia de reconocimiento que es necesaria para la manifestación de la acción de una enzima de restricción, e incluye un sitio de clivaje catalítico. Es apreciado que un sitio de clivaje puede o puede no ser contenido dentro de una porción de un sitio de restricción que comprende una secuencia de baja ambigüedad (es decir, una secuencia que contiene la determinante principal de la frecuencia de ocurrencia del sitio de restricción). De manera que, en muchos casos, los sitios de restricción relevantes contienen solamente una secuencia de baja ambigüedad, con un sitio interno de clivaje (por ejemplo, G/AATTC en el sitio EcoR II) o un sitio de clivaje inmediatamente adyacente (por ejemplo /CCWGG en el sitio EcoR II). En otros casos, enzimas de restricción relevantes [por ejemplo, el sitio Eco57 o CTGAAG(16/14)] contienen una secuencia de baja ambigüedad (por ejemplo la secuencia CTGAAG en el sitio Eco57 I), con un sitio de clivaje externo (por ejemplo en la porción N.sub.16 del sitio Eco57). Cuando se dice que una enzima (por ejemplo, una enzima de restricción) "corta" un poli nucleótido, se entiende que significa que la enzima de restricción cataliza o facilita un clivaje de un poli nucleótido.

En un aspecto no limitante, un "poli nucleótido seleccionable" es comprendido por una región terminal 5' (o región final), una región intermedia (es decir, una región interna o central), y una región terminal 3' (o región final). Como es utilizado en este aspecto, una región terminal 5' es una región que se ubica hacia un terminal de poli nucleótido 5' (o un fin de poli nucleótido 5'); de esta manera se encuentra, parcialmente o enteramente, en una mitad 5' de un poli nucleótido. De manera similar, una región terminal 3' es una región que se ubica hacia un terminal de poli nucleótido 3' (o un fin de poli nucleótido 2'); de esta manera se encuentra, parcialmente o enteramente, en una mitad 3' de un poli nucleótido. Como es utilizado en esta ejemplificación no limitante, puede haber sobre posición de secuencia entre dos regiones cualquiera o incluso entre las tres regiones.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de poli nucleótidos son idénticas (es decir, en una base nucleótido por nucleótido) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" es calculado comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) ocurre en ambas secuencias, para obtener el número de posiciones pareadas, dividiendo el número de posiciones pareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100, para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Dicha "identidad sustancial", como es utilizada en la presente solicitud, denota una característica de una secuencia de poli nucleótido, en donde el poli nucleótido comprende una secuencia que tiene al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 85 por ciento, a veces del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, y, comúnmente, al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación a una secuencia de referencia de una ventana de comparación de al menos de 25 a 50 nucleótidos, en donde el porcentaje de identidad de secuencia es calculado comparando la secuencia de referencia con la secuencia de poli nucleótido que podría incluir eliminaciones o adiciones que corresponden al 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia, a lo largo de la ventana de comparación.

Como es conocido en el estado de la técnica la "similitud" entre dos enzimas es determinada comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos conservados de aminoácidos de una enzima, con la secuencia de una segunda enzima. La similitud puede ser determinada por procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, un programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en National Center for Biological Information).

Los miembros de un par de moléculas (por ejemplo, un par anticuerpo-antígeno o un par de ácidos nucleicos) se considera que se encuentran "unidos específicamente" el uno al otro, si se unen entre ellos con una afinidad mayor que a otra molécula, no específica. Por ejemplo, un anticuerpo criado contra un antígeno al que se une más eficientemente que a una proteína no específica puede ser descrito como específicamente unido al antígeno. (De forma similar, una sonda de ácido nucleico puede ser descrita como específicamente unida a un ácido nucleico objetivo, si forma una dupla específica con el objetivo por medio de interacciones de bases emparejadas (ver más arriba)).

La "Hibridación específica" es definida en la presente solicitud como la formación de híbridos entre un primer poli nucleótido y un segundo poli nucleótido (por ejemplo, un poli nucleótido que tiene una secuencia distinta pero sustancialmente idéntica al primer poli nucleótido), en donde los poli nucleótidos sustancialmente no relacionados no forman híbridos en la mezcla.

El término "poli nucleótido específico" significa un poli nucleótido que tiene ciertos puntos terminales y que tiene una cierta secuencia de ácidos nucleicos. Dos poli nucleótidos, en donde un poli nucleótido tiene la secuencia idéntica a una porción del segundo poli nucleótido, pero terminales distintos comprende dos poli nucleótidos específicos

distintos.

Las "Condiciones de hibridación rigurosas" significan que la hibridación ocurrirá solamente si hay al menos un 90% de identidad, preferentemente el 95% de identidad y más preferentemente al menos el 97% de identidad entre las 5 secuencias. Ver Sambrook et al., *Molecular Cloning; a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, que se encuentra incorporado por referencia en su totalidad.

También incluidos en la invención se encuentran polipéptidos que tienen secuencias que son "sustancialmente idénticas" a la secuencia de un polipéptido de enzima. Una secuencia de aminoácido "sustancialmente idéntica" es 10 una secuencia que difiere de una secuencia de referencia solamente por sustituciones de aminoácidos conservados, por ejemplo, sustituciones de un aminoácido por otro del mismo tipo (por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina, o metionina, por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina).

15 Adicionalmente, una secuencia de aminoácido "sustancialmente idéntica" es una secuencia que difiere de una secuencia de referencia por uno o más sustituciones no conservadas, eliminaciones, o inserciones, particularmente cuando tal sustitución ocurre en un sitio que no es el sitio activo de la molécula y dado que el polipéptido retiene esencialmente sus propiedades de comportamiento. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser eliminados de un polipéptido de enzima, dando como resultado la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar 20 significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, aminoácidos amino- o carboxilo-terminales que no son requeridos para actividad biológica de la enzima, pueden ser suprimidos. Tales modificaciones pueden resultar en el desarrollo de polipéptidos activos más pequeños de enzima.

La presente invención proporciona una "enzima sustancialmente pura". El término "enzima sustancialmente pura" es 25 utilizado en la presente solicitud para describir una molécula, tal como un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de enzima o un fragmento del mismo), que se encuentra sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y otros materiales biológicos con que se asocia naturalmente. Por ejemplo, una molécula sustancialmente pura, tal como un polipéptido, puede ser al menos el 60% en peso seco, la molécula de interés. La pureza de los polipéptidos puede ser determinada usando métodos estándares incluyendo, por ejemplo, 30 electroforesis por gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE), cromatografía de columna (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)) y análisis de secuencia de aminoácido amino-terminal.

Como es utilizado en la presente solicitud, "sustancialmente pura" significa que una especie de objeto es la especie predominante presente (es decir, a base molar, es más abundante que cualquier otra especie macromolecular 35 individual en la composición), y fracción preferentemente sustancialmente purificada es una composición en donde la especie de objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (a base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 a 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. De mayor preferencia, la especie de objeto es purificada a homogeneidad esencial (especies contaminantes no pueden 40 ser detectadas en la composición a través de métodos convencionales de detección), en donde la composición consiste esencialmente de una única especie macromolecular. Las especies solventes, las moléculas pequeñas (<500 Daltons) y las especies iónicas elementales no son consideradas especies macromoleculares.

El término "tratar" incluye: (1) prevenir o retardar la aparición de síntomas clínicos del estado, desorden o condición 45 desarrollándose en un animal que puede ser afligido con o predispuesto al estado, desorden o condición, pero aún no experimenta o muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, desorden o condición; (2) inhibir el estado, desorden o condición (es decir, arrestar, reducir o retardar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma en caso de tratamiento de mantención, de al menos un síntoma clínico o subclínico de la misma); y/o (3) aliviar la condición (es decir, causar la regresión del estado, desorden o condición o al menos uno de sus síntomas clínicos o 50 subclínicos). El beneficio para un paciente a ser tratado es estadísticamente significativo o al menos perceptible al paciente o el médico.

Como es utilizado en la presente solicitud, el término "segmento variable" se refiere a una porción de un péptido naciente que comprende una secuencia aleatoria, pseudoaleatoria o una secuencia kernel definida. Un "segmento 55 variable" se refiere a una porción de un péptido naciente que comprende una secuencia aleatoria, pseudoaleatoria o una secuencia kernel definida. Un segmento variable puede comprender posiciones de residuo variantes e invariantes, y el grado de variación de residuo en una posición de residuo variante puede ser limitado: ambas opciones son seleccionadas a discreción del practicante. Típicamente, segmentos variables son de largo de aproximado 5 a 20 residuos de aminoácido (por ejemplo, 8 a 10), aunque los segmentos variables pueden ser más

largos y pueden comprender porciones de anticuerpos o proteínas receptoras, tales como un fragmento de anticuerpo, una proteína de unión a ácido nucleico, una proteína receptora, y similares.

El término "variante" se refiere a poli nucleótidos o polipéptidos de la invención, modificados en uno o más pares de bases, codones, intrones, exones, o residuos de aminoácido (respectivamente) de una molécula de proteína silvestre pariente. Pueden ser producidas variantes por cualquier número de medios incluyendo métodos tales como, por ejemplo, PCR propenso a errores, barajado, mutagénesis oligonucleótido dirigido, montaje de PCR, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis de casete, mutagénesis conjunto recursivo, mutagénesis conjunto exponencial, mutagénesis sitio-específico, re ensamblado genético, mutagénesis por saturación y cualquier combinación de las mismas. Son divulgadas en la presente solicitud técnicas para producir proteínas variantes que tienen una actividad reducida comparada con la proteína silvestre bajo una condición fisiológica normal de, por ejemplo, una o más condiciones de temperatura, pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos; y actividad potenciada bajo una condición aberrante. Pueden ser adicionalmente seleccionadas variantes para las propiedades de resistencia química potenciada y resistencia proteolítica, comparada con la proteína silvestre.

Como es utilizado en la presente solicitud, el término "silvestre" significa que el poli nucleótido no comprende mutación alguna. Un "anticuerpo de tipo silvestre", "un anticuerpo silvestre", se refieren a una proteína que puede ser aislada de la naturaleza, que será activada a un nivel de actividad encontrada en la naturaleza y que comprenderá la secuencia de aminoácido encontrada en la naturaleza. El término "molécula pariente" también se refiere al anticuerpo silvestre.

El término "funcional", como en "muestra funcional", por ejemplo, es simplemente una muestra con la que uno trabaja. De manera similar, una "molécula funcional", por ejemplo, es una molécula con la que uno trabaja.

La presente invención se encuentra dirigida a métodos de la ingeniería o evolución de anticuerpos silvestres para generar nuevas moléculas, que son reversiblemente o irreversiblemente inactivadas bajo la condición fisiológica normal, pero activas a condiciones anormales, al mismo o equivalente nivel que la condición fisiológica normal. Estas moléculas novedosas son referidas en la presente solicitud, como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo condicionalmente activos. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos son particularmente valiosos para el desarrollo de terapias novedosas que son activas por períodos cortos o limitados de tiempo dentro del huésped. Esto es particularmente valioso en donde la operación exhaustiva del anticuerpo a la dosis dada sería dañina para el huésped, pero donde la actividad limitada es requerida para llevar a cabo la terapia deseada. Ejemplos de aplicaciones benéficas incluyen tratamientos tópicos o sistémicos a alta dosis, como también tratamientos localizados a alta concentración. La inactivación bajo las condiciones fisiológicas normales puede ser determinada por una combinación de la dosificación y la tasa de inactivación del anticuerpo.

La presente invención se encuentra dirigida también a métodos de la ingeniería o evolución de anticuerpos para generar moléculas novedosas, que son diferentes de los anticuerpos de tipo silvestre en que son activadas reversiblemente o irreversiblemente a lo largo del tiempo, o activadas o inactivadas únicamente cuando se encuentran en ciertos microambientes en el cuerpo, incluyendo en órganos específicos en el cuerpo (tal como la vejiga o el riñón).

#### **Anticuerpos silvestres objetivos.**

Cualquier anticuerpo terapéutico puede servir como anticuerpo silvestre, para la producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos.

Los anticuerpos terapéuticos son aquellos que pueden ser usados en medicina, solos o en conjunto con otras terapias, para tratar varias enfermedades o condiciones médicas. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos de la invención pueden ser apropiados para uso en una o más indicaciones, incluyendo el tratamiento de desórdenes circulatorios, artritis, esclerosis múltiple, desórdenes autoinmunes, cáncer, condiciones dermatológicas y su uso en diversos formatos de diagnóstico. Dependiendo del anticuerpo e indicación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos podrían administrarse en formulaciones parenterales, tópicos u orales como se discute más abajo.

Algunos de los primeros modificadores de respuesta biológica fueron medicamentos cuyo objetivo era el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), una citoquina pro-inflamatoria involucrada en la patogénesis de RA. Diversos medicamentos anti-TNF-a son actualmente comercializados para el tratamiento de la RA. Por ejemplo, Enbrel®

(etanercept, Amgen) es un bloqueador de la TNF-alfa. Etanercept es una proteína dimérica de fusión que consiste en la porción extracelular que se une al ligando del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) humano de 75 kilo Dalton (p75), enlazada con la porción Fc del IgG1 humano. La componente Fc de etanercept contiene el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra, pero no el dominio CH1 del IgG1. Etanercept es producido en un sistema de expresión de célula mamífera de ovario de hámster chino (CHO). Consta de 934 aminoácidos y de un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilo Dalton. Enbrel® es utilizado para tratar artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante y psoriasis de plaquetas. Los efectos secundarios graves de Enbrel® incluyen infecciones que incluyen tuberculosis, infección fúngica, infección bacteriana o viral debida a patógenos oportunistas. También puede ocurrir septicemia. También han sido reportados linfomas u otros tumores malignos.

10 Remicade® (infliximab) es un anticuerpo monoclonal de IgGk1 quimérico anti-TNF-alfa compuesto de regiones humanas constantes y variables de murina. El remicade es suministrado por medio de inyección intravenosa y es usado para tratar artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y espondilitis anquilosante. Los efectos secundarios de Remicade incluyen septicemia o infección grave, y raramente ciertos linfomas de células

15 T. Otros efectos secundarios incluyen hepatotoxicidad, ciertos eventos hematológicos severos, reacciones por hipersensibilidad y ciertos eventos neurológicos severos.

Otros modificadores de respuesta biológica incluyen anticuerpos humanizados contra el receptor anti-interleuquina-6 (IL-6). IL-6 es una citoquina que contribuye a la inflamación, hinchazón y daño de articulaciones en RA. Un anticuerpo humanizado con el receptor anti-IL-6, Actemra (toilizumab, Roche), se encuentra aprobado por la FDA y la Comisión Europea para tratar pacientes adultos con artritis reumatoide. Actemra también se encuentra aprobado en Japón para el tratamiento de RA y artritis idiopática juvenil (sJIA). Estudios de fase III muestran que el tratamiento con Actemra como una monoterapia, o una combinación con MTX u otros DMARDs, redujo los signos y síntomas de RA, en comparación con otras terapias. Actemra es un anticuerpo humanizado monoclonal anti receptor humano de

20 IL-6 que bloquea competitivamente la unión de IL-6 a su receptor. De ésta manera, se inhiben los efectos por proliferación de IL-6, que llevan a un engrosamiento de la sinovial y la formación de queratitis vascular en RA. Los efectos secundarios graves de Actemra incluyen infecciones serias y reacciones por hipersensibilidad, incluyendo unos pocos casos de anafilaxis. Otros efectos secundarios incluyen infección del tracto respiratorio superior, dolor de cabeza, nasofaringitis, hipertensión y ALT aumentada.

30 Otra enfermedad autoinmune común es la psoriasis. Un sistema inmune sobre-activado puede llevar a altos niveles de IL-12 e IL-23, dos proteínas citoquinas que han sido encontradas en placas de piel psoriática. IL-12 e IL-23 se encuentran involucradas en respuestas inflamatorias e inmunes como la activación de células naturalmente asesinas y la diferenciación y activación de CD4 + células-T.

35 Otro tratamiento para la psoriasis moderada o severa involucra una inyección subcutánea de Stelara® (ustekinumab, Centocor Ortho Biotech, Inc.), un anticuerpo humanizado monoclonal de IgG1k contra la subunidad p40 de las citoquinas IL-12 e IL-23. Stelara ha mostrado que proporciona un alivio de ciertos síntomas asociados con placas psoriáticas, tales como el grosor de placa, descapado y rojez. La formulación para Stelara incluye L-histidina y L-histidina monohidrocloro monohidratada, polisorbato 80 y sucrosa en solución acuosa. El uso de Stelara® afecta al sistema inmune y puede aumentar las oportunidades de infección, incluyendo tuberculosis, e infecciones causadas por bacterias, hongos o virus; como también aumentar el riesgo de ciertos tipos de cáncer.

40

Los efectos secundarios de los modificadores de respuesta biológica son significativos y son causados, en parte, por

45 altos niveles después de la inyección en pacientes, que deja a los pacientes susceptibles a infecciones graves o la muerte. Este es un efecto secundario importante asociado con esta clase importante de fármacos. Es un reto evitar el alto nivel de actividad inicial de la dosis de anticuerpo requerida, para proporcionar un efecto de tratamiento prolongado después de la inyección.

50 En una modalidad, la invención proporciona un método para preparar un mediador condicionalmente activo de respuesta biológica, o un fragmento del mismo, que evita los altos niveles de actividad de la dosis de anticuerpos requerida para proporcionar un efecto prolongado de tratamiento después de la inyección. El método de la invención puede ser utilizado para diseñar anticuerpos para mediadores inflamatorios, tales como el IL-6, receptor de IL-6, TNF-alfa, IL-23 e IL-12 que son inactivos a condiciones de dosificación tal como la temperatura de ambiente, pero

55 lentamente se repliegan (reversiblemente o irreversiblemente) a la temperatura corporal. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos serían inactivos en una inyección inicial, pero se replegarían o reactivarían después de un período de horas o días cuando estén expuestos a la sangre, posterior a la inyección. Esto permitiría una dosificación más alta y una vida media (o períodos entre dosis) más larga, con efectos secundarios reducidos.

En un aspecto, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo condicionalmente activo a un mediador inflamatorio, o fragmento del mismo, que es inactivo bajo condiciones de dosificación tales como la temperatura del ambiente, pero lentamente se repliega (reversiblemente o irreversiblemente) a la temperatura corporal. El método comprende los siguientes pasos. Seleccionar un mediador inflamatorio. Reconocer previamente para identificar un anticuerpo al mediador inflamatorio, por medio de hibridoma. Humanizar el anticuerpo anti mediador inflamatorio. Evolucionar el anticuerpo anti mediador inflamatorio e identificar diferencialmente la unión a dos o más condiciones, por ejemplo, dos o más condiciones de temperatura, tal como a temperatura de ambiente y a 37 grados Celsius o mayor; seleccionar para mutaciones que son inactivas a una primera condición, relativa al tipo silvestre, pero que muestren actividad aumentada (por ejemplo, unión), relativa a la actividad del anticuerpo de tipo silvestre (unión) a una segunda condición. Los supermutantes identificados en los cambios pesados y livianos, son posteriormente recombinados dentro de las cadenas pesadas y livianas, así como también por medio de asociación combinatoria de las cadenas pesadas y livianas. La selección de estas cadenas pesadas y livianas es repetida bajo ambas condiciones, por ejemplo, a temperatura de ambiente y a 37 grados Celsius o más. Además, los anticuerpos o fragmentos recombinados pueden ser identificados por actividad y estabilidad bajo condiciones de almacenamiento y fisiológicas.

Alternativamente, el anticuerpo silvestre contra el mediador inflamatorio es un anticuerpo conocido o variante o fragmento activo del mismo.

20 En un aspecto, la condición primera y segunda es seleccionada de condiciones de pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos. En otro aspecto, el mediador inflamatorio es seleccionado de IL-6, receptor IL-6, TNF-alfa, IL-23 e IL-12.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo condicionalmente activo contra IL-6, o un fragmento del mismo, que es inactivo bajo condiciones de dosificación, tales como temperatura de ambiente, pero, lentamente, se repliega (reversiblemente o irreversiblemente) a temperatura del cuerpo. El método comprende las siguientes etapas. Identificar una biblioteca humana completa para un anticuerpo de IL-6. Evolucionar el anticuerpo de IL-6 e identificar diferencialmente moléculas a temperatura de ambiente y a 37 grados Celsius o más; seleccionar mutaciones que son inactivas a temperatura de ambiente, relativas al tipo silvestre, pero que muestren actividad aumentada (por ejemplo, de unión) relativa a la actividad (de unión) del anticuerpo de tipo silvestre. Los supermutantes identificados en los cambios pesados y livianos son después recombinados dentro de las cadenas pesada y ligera, así como también por asociación combinatoria de las cadenas pesada y ligera. La selección de estas cadenas pesada y ligera recombinadas es repetida, a temperatura de ambiente y la temperatura mayor. Además, los anticuerpos o fragmentos recombinados son testeados por actividad y estabilidad bajo condiciones de almacenamiento y fisiológicas.

Los anticuerpos condicionalmente activos anti-IL-6 identificados y producidos pueden ser usados en un método para tratar una enfermedad autoinmune, tal como artritis reumatoide o psoriasis, por medio del suministro de una cantidad efectiva a un paciente necesitado del mismo, con una reducción en la gravedad de los efectos secundarios en comparación al suministro de un modificador de respuesta biológica tradicional, un anticuerpo anti-IL-6. Una ventaja de este método es que permite relajar o emparejar la cantidad de fármaco a lo largo del período de tratamiento, en relación con la actual alta cantidad de fármaco modificador de respuesta biológica, seguido por la vida media de eliminación a lo largo de semanas o meses.

45 Son utilizadas una o más técnicas de muta génesis para evolucionar el ADN que codifica el anticuerpo silvestre, para crear una biblioteca de ADN mutante; el ADN mutante se expresa para crear una biblioteca de anticuerpos mutantes; y la biblioteca se sujeta a una prueba de reconocimiento bajo una condición fisiológica normal y bajo una o más condiciones aberrantes. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos se seleccionan de los anticuerpos mutantes, que exhiben tanto (a) una reducción en actividad en el ensayo a la condición fisiológica normal, en comparación con el anticuerpo silvestre, como (b) un aumento en la actividad en el ensayo bajo la condición aberrante, en comparación con el anticuerpo silvestre. Alternativamente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos son seleccionados de los anticuerpos mutantes que exhiben cambios en su actividad, reversiblemente o irreversiblemente, en dos o más condiciones fisiológicas diferentes.

#### 55 GENERACIÓN DE MOLÉCULAS EVOLUCIONADAS A PARTIR DE MOLÉCULA PARIENTE

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos pueden ser generados a través de un proceso de mutagénesis selección de mutaciones individuales, para una reducción en la actividad a la condición fisiológica normal con actividad en condiciones aberrantes, manteniéndose igual o mejor que la actividad a la

condición fisiológica normal.

La invención proporciona para un método para generar una variante de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, en donde la variante tiene una actividad biológica alterada de  
 5 aquella que ocurre naturalmente, el método comprende (a) modificar el ácido nucleico por medio de (i) sustituir uno o más nucleótidos por un nucleótido diferente, en donde el nucleótido comprende un nucleótido natural o no natural; (ii) eliminar uno o más nucleótidos, (iii) agregar uno o más nucleótidos, o (iv) cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el nucleótido no natural comprende inosina. En otro aspecto, el método, además, comprende testear  
 10 los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos codificados por los ácidos nucleicos modificados para encontrar actividad condicional, de manera que se identifican los ácidos nucleicos modificados que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la actividad condicional. En un aspecto, la modificación del paso (a) son realizadas por PCR, PCR propenso a error, barajado, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, montaje de PCR, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis de cinta, mutagénesis de conjunto  
 15 recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis de sitio-específico, re ensamblado genético, mutagénesis por saturación, reacción de la cadena ligasa, mutagénesis in vitro, reacción de la cadena ligasa, síntesis de oligonucleótido, cualquier técnica generadora de ADN y cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el método además comprende al menos una repetición del paso de modificación (a).

La invención además proporciona un método para generar un poli nucleótido a partir de dos o más ácidos nucleicos,  
 20 el método comprende: (a) identificar regiones de identidad y regiones de diversidad entre dos o más ácidos nucleicos, en donde al menos uno de los ácidos nucleicos comprende un ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar un juego de oligo nucleicos que corresponden, en secuencia, a al menos dos de los dos o más ácidos nucleicos; y, (c) extender los oligonucleótidos con una polimerasa, de manera que genere el poli nucleótido.

25 En varias modalidades de la invención, puede ser empleada cualquier técnica de mutagénesis. La mutagénesis estocástica o aleatoria es ejemplificada por una situación en que una molécula pariente es mutada (modificada o cambiada) para resultar en un juego de moléculas progénicas, que tienen mutaciones que no son predeterminadas. De esta manera, en una reacción mutagénica estocástica in vitro, por ejemplo, no hay un producto predeterminado particular cuya producción es intencionada; más bien hay una incertidumbre —por ende, aleatoriedad— en cuanto a  
 30 la naturaleza exacta de las mutaciones logradas y, de esta manera, también en cuanto a los productos generados.

La mutagénesis estocástica se manifiesta en procesos como PCR propenso a error y barajado estocástico, en donde las mutaciones logradas son aleatorias o predeterminadas. Las formas variantes pueden ser generadas por transcripción propensa a error, tal como un PCR propenso a error o uso de una polimerasa que carece de actividad  
 35 de revisión (ver, Liao (1990) Gene 88:107-111), de la primera forma variante, o, por replicación de la primera forma en una hebra mutadora (las células huéspedes mutadoras son discutidas con más detalle abajo, y son, generalmente, conocidas). Una hebra mutadora puede incluir cualquier mutante en cualquier organismo impedido de las funciones de reparación de bases mal emparejadas. Estos incluyen productos de gen mutante de mutS, mutT, mutH, mutL, ovrD, dcm, vsr, umuC, umuD, sbcB, recJ, etc. El impedimento es logrado por mutación genética,  
 40 reemplazo alélico, inhibición selectiva por un reactivo adicionado tal como un compuesto pequeño o un ARN expresado anti sentido, u otras técnicas. El impedimento puede ser de los genes notados, o de genes homólogos en cualquier organismo.

Los métodos actuales de mutagénesis de uso común para crear proteínas alternativas de una molécula de inicio son  
 45 tecnologías de mutagénesis dirigidas a oligonucleótidos, reacciones de cadena de polimerasa propensa a error (PCR propenso a error) y mutagénesis de casete, en que la región específica a ser optimizada es reemplazada con un oligonucleótido mutagenizado sintéticamente. En estos casos, un número de sitios mutantes son generados alrededor de ciertos sitios en la secuencia original.

50 En la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, una secuencia corta es reemplazada con un oligonucleótido mutagenizado sintéticamente. En la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, una secuencia corta del poli nucleótido es extraída del poli nucleótido, usando digestión de enzima de restricción, y es reemplazada con un poli nucleótido sintético, en el que varias bases han sido alteradas de la secuencia original. La secuencia de poli nucleótido también puede ser alterada por mutagénesis química. Los mutágenos químicos incluyen, por ejemplo, bisulfato de sodio,  
 55 ácido nitroso, hidroxilamina, hidracina, o ácido fórmico. Otros agentes que son análogos de precursores de nucleótidos incluyen nitrosoguanidina, 5-bromouracil, 2-aminopurina, o acridina. Generalmente, estos agentes son añadidos a la reacción PCR, en lugar del precursor nucleótido, de manera que mutan la secuencia. También puede ser utilizado el intercalar agentes tales como proflavina, acriflavina, quinacrina y similares. La mutagénesis aleatoria de la secuencia poli nucleótido también puede ser lograda por irradiación con rayos-X o luz ultravioleta.

Generalmente, los poli nucleótidos de plásmidos mutagenizados son introducidos dentro de *E. coli* y propagados como una piscina o biblioteca de plásmidos híbridos.

5 El PCR propenso a error usa condiciones de polimerización de baja fidelidad, para introducir un nivel bajo de mutaciones puntuales aleatoriamente a lo largo de una secuencia larga. En una mezcla de fragmentos de secuencia desconocida, el PCR propenso a error puede ser usado para mutagenizar la mezcla.

10 En mutagénesis de casete, un bloque de secuencia de una plantilla única es típicamente reemplazado por una secuencia aleatoria (o parcialmente aleatoria). Reidhaar-Olson J F y Sauer R T: Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241(4861):53-57, 1988.

15 Alternativamente, puede ser empleada en varias modalidades de la invención cualquier técnica de mutagenesis no estocástica o no aleatoria. La mutagénesis no estocástica es ejemplificada por una situación en que una molécula pariente es mutada (modificada o cambiada) para dar como resultado una molécula progénica que tiene una o más mutaciones predeterminadas. Se aprecia que la presencia de productos de fondo, en cierta cantidad, es una realidad en muchas reacciones donde ocurre procesamiento molecular, y la presencia de estos productos de fondo no quita mérito a la naturaleza no estocástica de un proceso mutagénico que tiene un producto predeterminado. La mutagénesis por saturación de sitio y rearmado de ligadura sintética, son ejemplos de técnicas de mutagénesis donde se determina la estructura química exacta de los productos.

20 Un método de mutagénesis por saturación de sitio es divulgado en la publicación de solicitud de patente U.S. 2009/0130718. Este método proporciona un juego de cebadores degenerados, correspondientes a codones de un poli nucleótido plantilla, y realiza una elongación de polimerasa para producir poli nucleótidos progénicos, que contienen secuencias que se corresponden con los cebadores degenerados. Los poli nucleótidos progénicos pueden ser expresados y revisados por evolución directa. Específicamente, este es un método para producir un juego de poli nucleótidos progénicos, que comprende los pasos de (a) proporcionar copias de un poli nucleótido plantilla, cada una comprendiendo una pluralidad de codones que codifican una secuencia polipéptido de plantilla; y (b) por cada codón del poli nucleótido plantilla, realizar los pasos de (1) proporcionar un juego de cebadores degenerados, donde cada cebador comprende un codón degenerado correspondiente al codón del poli nucleótido plantilla y al menos una secuencia adyacente que es homóloga a una secuencia adyacente al codón del poli nucleótido plantilla; (2) proporcionar condiciones que permitan que los cebadores hibriden con las copias de los poli nucleótidos plantilla; y (3) llevar a cabo una reacción de elongación de polimerasa desde los cebadores a lo largo de la plantilla; de manera que se producen poli nucleótidos progénicos, cada uno de los cuales contiene una secuencia correspondiente al codón degenerado del cebador hibridado; de manera que se produce un juego de poli nucleótidos progénicos.

35 La mutagénesis por saturación de sitio se relaciona con la evolución dirigida de ácidos nucleicos y la selección de clones que contienen los ácidos nucleicos evolucionados, por actividad o actividades resultantes de interés, tales como actividades de ácido nucleico y/o actividades de interés de proteínas específicas, particularmente de enzimas. Las moléculas mutagenizadas entregadas por esta técnica pueden tener moléculas quiméricas y moléculas con mutaciones puntuales, incluyendo moléculas biológicas que contienen un componente carbohidrato, un lípido, un ácido nucleico, y/o proteína, y ejemplos específicos, pero no limitantes, de éstos, incluyen antibióticos, anticuerpos, enzimas y hormonas esteroidales y no esteroidales.

45 La mutagénesis por saturación de sitio se relaciona generalmente con un método de: 1) preparar una generación progénica de moléculas (incluyendo una molécula que se compone de una secuencia de poli nucleótidos, una molécula que se compone de una secuencia polipéptido y una molécula que se compone de en parte una secuencia poli nucleótido y en parte de una secuencia polipéptido), que son mutagenizadas para lograr al menos una mutación puntual, adición, eliminación, y/o quimerización, de una o más plantillas de generación parental o ancestral; 2) identificar la generación de moléculas progénicas --preferentemente usando un método de alto rendimiento-- en base a al menos una propiedad de interés (tal como una mejora en una actividad enzimática o un aumento en la estabilidad o un efecto quimioterapéutico novedoso); 3) obtener opcionalmente y/o catalogar información estructural y/o funcional relativa a la generación de moléculas parentales y/o progénicas; y 4) repetir opcionalmente cualquiera de los pasos 1) a 3).

55 En la mutagénesis por saturación de sitio, es generado (por ejemplo, de una platilla de poli nucleótido pariente) --en lo que se denomina "mutagénesis sitio de codón por saturación de"-- una generación de poli nucleótidos progénicos, cada uno de los cuales tiene al menos un juego de hasta tres mutaciones puntuales contiguas (es decir, diferentes bases que comprenden un nuevo codón), de manera que cada codón (o cada familia de codones degenerados que codifica el mismo aminoácido) es representado en cada posición de codón. Correspondiente a --y codificada por--

- esta generación de poli nucleótidos progénicos, se genera también un juego de polipéptidos progénicos, cada uno de los cuales tiene al menos una mutación puntual única de aminoácido. En un aspecto preferido, es generado --en lo que se denomina "mutagénesis de aminoácido por saturación de sitio" -- un polipéptido mutante por cada una de las 19 sustituciones de alfa-aminoácidos naturalmente codificadas, formadores de polipéptidos en cada y todas las
- 5 posiciones de aminoácido a lo largo del polipéptido. Esto resulta en —por cada y todas las posiciones de aminoácido a lo largo del polipéptido parental— un total de 20 polipéptidos progénicos distintos, incluyendo el aminoácido original, o potencialmente más de 21 polipéptidos progénicos distintos, si aminoácidos adicionales son utilizados en vez de o en adición a los 20 aminoácidos naturalmente codificados.
- 10 También pueden ser empleadas otras técnicas de mutagénesis que involucren recombinación y, más específicamente, un método para preparar poli nucleótidos que codifican un polipéptido por un método de reordenamiento in vivo de secuencias de poli nucleótidos, que contienen regiones de homología parcial, armando los poli nucleótidos para formar, al menos, un poli nucleótido e identificar los poli nucleótidos para la producción de polipéptidos que tengan una propiedad útil.
- 15 En otro aspecto, las técnicas de mutagénesis explotan la propiedad natural de las células para recombinar moléculas y/o mediar en procesos reductivos, que reducen la complejidad de secuencias y el grado de secuencias repetidas o consecutivas que procesan regiones de homología.
- 20 Pueden ser utilizadas, solas o en combinación, varias técnicas de mutagénesis, para entregar un método para generar poli nucleótidos híbridos que codifican polipéptidos biológicamente activos híbridos con actividades potenciadas. Para lograr esto y otros objetivos, se proporciona, de acuerdo con un aspecto de la invención, un método para introducir poli nucleótidos en una célula huésped adecuada y cultivar la célula huésped bajo condiciones que producen un poli nucleótido híbrido.
- 25 Se han producido juntando 2 fragmentos de poli nucleótidos, genes quiméricos, usando extremos pegajosos compatibles generados por enzimas de restricción, en donde cada fragmento es derivado de una molécula progenitora (o parental) separada. Otro ejemplo, es la mutagénesis de una posición única de codón (es decir, para lograr una sustitución, adición, o eliminación de codón), en un poli nucleótido parental, para generar un poli
- 30 nucleótido progénico único, que codifica para un polipéptido mutagenizado de sitio único.
- Además, sistemas recombinantes sitio específicos in vivo han sido utilizados para generar híbridos de genes, así como también como métodos aleatorios de recombinación in vivo, y recombinación entre genes homólogos pero truncados sobre un plásmido. La mutagénesis también ha sido reportada por superposición de extensión y PCR.
- 35 Se han utilizado métodos no aleatorios para lograr grandes números de mutaciones puntuales y/o quimerizaciones, por ejemplo, aprontes comprensivos y exhaustivos han sido usados para generar todas las especies moleculares dentro de una agrupación particular de mutaciones, para atribuir funcionalidad a grupos estructurales específicos en una molécula plantilla (por ejemplo, una posición de un aminoácido específico o una secuencia comprendida por dos
- 40 o más posiciones de aminoácidos), y para categorizar y comparar agrupaciones específicas de mutaciones.
- Cualquiera de estos u otros métodos de evolución, pueden ser empleados en la presente invención, para generar una nueva población de moléculas (biblioteca) desde una o más moléculas parientes.
- 45 Una vez formados, los constructos pueden o pueden no ser fraccionados sobre un gel de agarosa de acuerdo con protocolos publicados, insertado a un vector de clonación, y transfectedo a una célula huésped apropiada.

#### **EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS EVOLUCIONADAS**

- 50 Una vez generada una biblioteca de moléculas mutantes, el ADN puede ser expresado utilizando técnicas rutinarias de biología molecular. De ésta manera, la expresión de una proteína puede ser dirigida usando varios métodos conocidos.
- Por ejemplo, brevemente, un gen de tipo silvestre puede ser evolucionado usando cualquier variedad de métodos
- 55 aleatorios o no aleatorios tales como los indicados en la presente solicitud. Las moléculas de ADN mutante son después digeridas y ligadas en un ADN vector, tal como ADN de plásmido, usando técnicas estándares de biología molecular. El ADN vector que contiene mutantes individuales es transformado en bacteria u otras células, usando protocolos estándares. Esto puede ser realizado en un pocillo individual de una bandeja de múltiples pocillos, tal como una bandeja de 96 pocillos para expresión y selección de alto rendimiento. El proceso es repetido para cada

molécula mutante.

Los poli nucleótidos seleccionados y aislados como ha sido descrito, son introducidos en una célula huésped adecuada. Una célula huésped adecuada y cualquier célula que sea capaz de promover la recombinación y/o el reordenamiento reductivo. Los poli nucleótidos seleccionados, preferentemente, ya se encuentran en un vector que incluye un control de secuencias apropiado. La célula huésped puede ser una célula eucarionte superior, la célula huésped puede ser una célula procarionte, tal como una célula bacteriana. La introducción de un constructo a la célula huésped puede ser realizado por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE\_Dextran, o electroporación (por ejemplo, Ecker and Davis, 1986, Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA, Proc Natl Acad Sci USA, 83:5372-5376).

Como ejemplos representativos de vectores de expresión que pueden ser utilizados, pueden ser mencionadas partículas virales, báculo virus, fago, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósidos, cromosomas bacterianos artificiales, ADN viral (por ejemplo, vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar, pseudo rabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualquier otro vector específico para huéspedes específicos de interés (tales como bacillos, aspergillus y levadura). De esta manera, por ejemplo, el ADN puede ser incluido en cualquiera de una variedad de vectores de expresión, para expresar un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosomales, no cromosomales y sintéticas. Son conocidos por los expertos en la técnica gran cantidad de vectores adecuados y están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores son aportados a modo de ejemplo, Bacteriano: vectores pQE (Qiagen), plásmidos pBluescript, vectores pNH, vectores lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucarionte: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Sin embargo, puede ser utilizado cualquier otro plásmido u otro vector, siempre que sea replicable y viable en el huésped. Pueden ser utilizados en la presente invención vectores de bajo número de copias o alto número de copias.

La secuencia de ADN en el vector de expresión se encuentra enlazada operativamente con una secuencia (promotor) de control de expresión apropiada para dirigir la síntesis de ARN. Los promotores bacterianos de nombre particular incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL y trp. Los promotores eucariontes incluyen CMV intermedio temprano, HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, LTRs desde retrovirus, y metalotioneina-1 de ratón. La selección del vector y del promotor apropiado se encuentra dentro del nivel de una persona experta en la materia. El vector de expresión también contiene un sitio de unión de ribosoma, para iniciación de traducción, y un terminador de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Las regiones promotoras pueden ser seleccionadas de entre cualquier gen deseado, usando vectores de cloranfenicol transferasa (CAT) u otros vectores con marcadores seleccionables. Además, los vectores de expresión contienen. Preferentemente, uno o más genes marcadores seleccionables, para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tales como resistencia a la dihidrofolato reductasa o la neomicina, para cultivos de células eucariontes, o tal como resistencia a la tetraciclina o la ampicilina en E. coli.

De esta manera, en otro aspecto de la invención, poli nucleótidos novedosos pueden ser generados por el proceso de reordenamiento reductivo. El método involucra la generación de constructos que contienen secuencias consecutivas (secuencias codificadoras originales), su inserción en un vector apropiado, y su introducción subsecuente en una célula huésped adecuada. El reordenamiento de las identidades moleculares individuales ocurre por procesos combinatorios, entre las secuencias consecutivas en las regiones de homología de procesamiento de constructos, o entre unidades cuasi-repetidas. El proceso de reordenamiento recombina y/o reduce la complejidad y extensión de las secuencias repetidas y da como resultado la producción de especies moleculares novedosas. Se puede aplicar varios tratamientos para potenciar la tasa de reordenamiento. Estos podrían incluir tratamiento con luz ultravioleta o químicos dañadores de ADN y/o el uso de líneas de célula huésped que muestren niveles aumentados de "inestabilidad genética". De esta manera, el proceso de reordenamiento puede involucrar la recombinación homóloga o la propiedad natural de secuencias cuasi-repetidas para dirigir su propia evolución.

En un aspecto, el organismo o la célula huésped comprende una bacteria Gram negativa, una bacteria Gram positiva o un organismo eucarionte. En otro aspecto de la invención, la bacteria Gram negativa comprende Escherichia coli o Pseudomonas fluorescens. En otro aspecto de la invención, la bacteria Gram positiva comprende Streptomyces diversa, Lactobacillus gasserii, Lactococcus lactis, Lactococcus cremoris o Bacillus subtilis. En otro aspecto de la invención, el organismo eucarionte comprende Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Pichia pastoris, Kluyvermyces lactis, Hansenula polymorpha o Aspergillus niger. Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados, pueden ser mencionados: células bacterianas, tales como E. coli, Streptomyces Salmonella typhimurium; células fúngicas, tales como levadura; células de insecto, tal como Drosophila

S2 y Spodoptera Sf9; células animales, tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; y células vegetales. La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de aquellos que sean expertos en la materia, a partir de las enseñanzas de la presente solicitud.

- 5 Con referencias particulares a varios sistemas de cultivo celular mamífero que puede ser usados para expresar proteínas recombinantes, ejemplos de sistemas expresión mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descrito en "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981) y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor
- 10 y potenciador adecuado, y también cualquier sitio ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, donante de empalme y sitios de aceptor, secuencias de terminación transcripcional, y secuencias 5' no transcritas que flanquean. Las secuencias de ADN derivadas del empalme de SV40 y sitios poliadenilación pueden ser utilizados para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.
- 15 Las células son luego propagadas y el "reordenamiento reductivo" se lleva a cabo. La velocidad del proceso de reordenamiento reductivo puede ser estimulada con la introducción de daño de ADN si es deseado. El reordenamiento in vivo se focaliza en procesos "inter-moleculares", colectivamente referidos como "recombinación" que, en bacterias, es generalmente visto como un fenómeno "RecA-dependiente". La invención puede depender de procesos de recombinación de una célula huésped para recombinar y reordenar secuencias, o la habilidad de las
- 20 células de mediar en procesos reductivos, para disminuir la complejidad de las secuencias cuasi-repetidas en la célula por eliminación. El proceso de "reordenamiento reductivo" ocurre por un proceso RecA-independiente "intra-molecular". El resultado final es un reordenamiento de las moléculas en todas las combinaciones posibles.

Las células huésped que contienen los poli nucleótidos de interés, pueden ser cultivadas en medios de nutrientes

25 convencionales modificados para ser apropiados para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tal como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán aparentes para la persona experta en la materia.

La expresión de proteínas puede ser inducida por una variedad de métodos conocidos y muchos sistemas genéticos

30 han sido publicados para la inducción de la expresión de proteínas. Por ejemplo, con sistemas apropiados, la adición de un agente inductor que inducirá la expresión de proteínas. Las células después pasan a tener forma de pellet por medio de centrifugación y remoción de sobrenadante. La proteína periplásmica puede ser enriquecida por la incubación de las células con ADNasa, ARNasa, y lisozima. Después de la centrifugación, el sobrenadante, que contiene la nueva proteína, es transferido a una bandeja de múltiples pocillos y es almacenado previo a su testeo.

35 Las células son típicamente cosechadas por medio de centrifugación, fraccionadas por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante es retenido para mayor purificación. Las células microbianas utilizadas para la expresión de proteínas pueden ser fraccionadas por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelado-descongelado, sonicación, fraccionado mecánico, o el uso de agentes de lisis de células. Tales métodos son

40 conocidos para aquellos expertos en la materia. El polipéptido expresado o fragmento del mismo puede ser recuperado y purificado de cultivos de células recombinantes, por métodos que incluyen sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de anión o catión, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Las etapas de re plegamiento de proteína pueden ser utilizadas, según sea necesario, para

45 completar la configuración del polipéptido. Si es deseado, puede ser empleada para los pasos finales de purificación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Los clones que son identificados como poseedores de la actividad deseada, puede ser secuenciados, posteriormente, para identificar la secuencia polinucleótida que codifica una enzima que tiene la actividad

50 potenciada.

Los polipéptidos que son identificados de dichas bibliotecas, pueden ser utilizados para fines terapéuticos, de diagnóstico, investigación y relacionados, y/o pueden ser sujetos a uno o más ciclos adicionales de barajado y/o selección. La invención proporciona un fragmento del anticuerpo condicionalmente activo, que tiene al menos 10

55 aminoácidos de largo y en donde el fragmento tiene actividad.

La invención proporciona, un polipéptidocodón-optimizado o un fragmento del mismo, en donde el uso del codón es optimizado para un organismo o una célula particular. Narum et al., "Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium faciparum* merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice".

- Infect. Immun. 2001 Diciembre, 69(12):7250-3 describe optimización de codones en el sistema de ratón. Outchkourov et al., "Optimization of the expression of Equistatin in *Pichia pastoris*, protein expression and purification", Protein Expr. Purif. 2002 Febrero; 24(1):18-24, describe la optimización de codones en el sistema de levadura. Feng et al., "High level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane binding domain" Biochemistry 2000 Dec. 19, 39(50): 15399-409, describe la optimización de codones en *E. coli*. Humphreys et al., "High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence", Protein Expr. Purif. 2000 Nov. 20(2): 252-64, describe como el uso de codones afecta la secreción en *E. coli*.
- 10 La evolución de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos, puede ser auxiliada por la disponibilidad de una selección o un proceso de selección conveniente de alto rendimiento.
- Una vez identificado, los polipéptidos y péptidos de la invención pueden ser sintéticos, o ser polipéptidos generados de manera recombinante. Los péptidos y las proteínas pueden ser expresados de manera recombinante in vitro o in vivo. Los péptidos y polipéptidos de la invención pueden ser generados y aislados usando cualquier método conocido en el estado de la técnica. Los polipéptidos y péptidos de la invención también pueden ser sintetizados, por completo o en parte, usando métodos químicos conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, Caruthers (1980) "New chemical methods for synthesizing polynucleotides", Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Horn (1980), "Synthesis of oligonucleotides on cellulose. Part II: design and synthetic strategy to the synthesis of 22 oligodeoxynucleotides coding for Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP)", Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A. K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede llevarse a cabo usando varias técnicas de fase sólida (ver, por ejemplo, Roberge (1995) "A strategy for a convergent synthesis of N-linked glycopeptides on a solid support", Science 269:202; Merrifield (1997) "Concept and early development of solid-phase peptide synthesis", Methods Enzymol. 289:3-13) y la síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer), de acuerdo con las instrucciones entregadas por el fabricante.
- Los péptidos y los polipéptidos de la invención también pueden ser glicosilados. La glicosilación puede ser agregada post translacionalmente químicamente o por mecanismos biosintéticos, en donde, este último, incorpora el uso de motivos de glicosilación conocidos, que puede ser nativos a la secuencia o pueden ser agregados, como un péptido o agregado en la secuencia de ácido nucleico que codifica. La glicosilación puede ser O-enlazada o N-enlazada.
- Los péptidos y polipéptidos de la invención, como se encuentran definidos arriba, incluyen todas las formas "miméticas" y "péptido miméticas". Los términos "miméticas" y "péptido miméticas" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos de la invención. Los miméticos pueden ser enteramente compuestos de aminoácidos sintéticos, o análogos no naturales, o, es una molécula quimérica parcialmente de aminoácidos de péptido natural y, parcialmente, de análogos no naturales de aminoácidos. Los miméticos también pueden incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservantes de aminoácidos naturales, mientras que dichas sustituciones también no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Como con los polipéptidos de la invención, que son variantes conservantes, la experimentación rutinaria determinará si un mimético se encuentra dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no se encuentra sustancialmente alterada.
- Las composiciones de mimético de polipéptido de la invención pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales. En un aspecto alternativo, composiciones miméticas de la invención incluyen uno o todos de los siguientes tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de residuo que no son los enlaces de unión natural de amida (enlace péptido); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácido que ocurren naturalmente; o c) residuos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, un giro beta, giro gamma, una capa beta, una conformación de hélice alfa y similares. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede ser caracterizado como un mimético cuando todos o algunos de sus residuos son unidos por medios químicos que no sean las uniones naturales de péptidos. Residuos péptido miméticos individuales pueden ser unidos por enlaces de péptido, otros enlaces químicos o medios de acople, tales como, por ejemplo, glutaraldehído, N-hidroxisuccinimida diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de enlace que pueden ser una alternativa al enlace de unión natural de amida ("enlace de péptido") incluyen, por ejemplo, ketometileno (por ejemplo, --C(.dbd.O)—CH.sub.2—para —C(.dbd.O)—NH—), aminometileno (CH.sub.2—NH), etileno, olefina (CH.dbd.CH), éter (CH.sub.2—O), tioéter (CH.sub.2—S), tetrazol (CN.sub.4--), tiazol, retro amida, tioamida, o éster (ver, por ejemplo, Spatola (1983) en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcell Dekker, N.Y.).

- Un polipéptido de la invención también puede ser caracterizado como un mimético por contener todos o algunos residuos no naturales, en lugar de los residuos de aminoácido que ocurren naturalmente. Los residuos no naturales se encuentran bien descritos en la literatura científica y de patentes; unos pocos ejemplos de composiciones no naturales útiles como miméticos de residuos naturales de aminoácido y como guía, se describen más abajo. Los miméticos de aminoácidos miméticos pueden ser generados reemplazando, por ejemplo, D- o L-naftilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tieneilalanina; D- o L-1,2,3-, o 4-pireneilalanina; D- o L-3-tieneilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; D- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquilo)alaninas; y, D- o L-alquilalaninas, donde alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo, isopentilo sustituido o no sustituido, o un aminoácido no ácido. Anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, los anillos aromáticos tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, benzimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo, y piridilo.
- 15 Los miméticos de aminoácidos ácidos pueden ser generados por sustitución por, por ejemplo, aminoácidos no carboxilados mientras mantienen una carga negativa; (fosfona)alanina; treonina sulfatada. Grupos carboxilos laterales (por ejemplo, aspartilo o glutamilo), también pueden ser modificados selectivamente por reacción con carbodiimida o 1-etil-3(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Aspartilo o glutamilo también pueden ser convertidos en residuos asparaginilo y glutaminilo por medio de la reacción con iones amonio. Los miméticos de aminoácidos básicos pueden ser generados por sustitución con, por ejemplo, (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornirina, citrulina, o ácido (guanidino)-acético, o ácido (guanidino)alquilo-acético, donde alquilo es definido arriba. Un derivado de nitrilo (por ejemplo, que contiene la porción CN en lugar de COOH) puede ser sustituido por asparagina o glutamina. Los residuos asparaginilo y glutaminilo pueden ser desaminados hasta el residuo aspartilo o glutamilo correspondiente. Los miméticos del residuo arginina pueden ser generados por medio de la reacción de arginilo con, por ejemplo, uno o más reactivos convencionales, incluyendo, por ejemplo, fenilgloxal, 2,3-butadiona, 1,2-ciclohexanodiona, o ninhidrina, preferentemente bajo condiciones alcalinas. Los miméticos del residuo tirosina pueden ser generados por medio de reacción de tirosil con, por ejemplo, compuestos aromáticos diazonios o tetranitrometano. N-acetilimidazol y tetranitrometano pueden ser usados para formar especies O-acetil tirosil y derivados 3-nitro, respectivamente. Los miméticos del residuo cisteína pueden ser generados por medio de la reacción de residuos cisteinilos con, por ejemplo, halo acetatos-alfa, tal como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida y las aminas correspondientes; para entregar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los miméticos del residuo cisteína también pueden ser generados por medio de la reacción de residuos cisteinilos con, por ejemplo, ácido bromo-trifluoroacetona, alfa-bromo-beta-(5-imidozolil) propiónico; cloroacetil fosfato, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro; metil 2-piridil disulfuro; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol; o, cloro-7-nitrobenzeno-oxa-1,3-diazol. Los miméticos de lisina pueden ser generados (y residuos de terminal amino pueden ser alterados), por medio de la reacción de lisinil con, por ejemplo, anhídrido de ácido succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. Los miméticos de la lisina y otros residuos que contienen aminos alfa también pueden ser generados por medio de la reacción con imidoesteres, tales como metil picolinimidato, fosfato piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzensulfónico, O-metilisourea, 2,4, pentanodiona, y reacciones catalizadas por la transaminasa con glicoxilato. Los miméticos de metionina pueden ser generados por medio de la reacción con, por ejemplo, sulfóxido de metionina. Los miméticos de prolina incluyen, por ejemplo, ácido piperídico, ácido tiazolidin carboxílico, 3- o 4-hidroxi prolina, deshidroprolina, 3- o 4-metilprolina, o 3,3,-dimetilprolina. Los miméticos del residuo histidina pueden ser generados por medio de la reacción de histidilo con, por ejemplo, dietilprocarbonato o bromuro de para-bromofenacil. Otros miméticos incluyen, por ejemplo, aquellos generados por la hidroxilación de prolina y lisina; fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos serilo y treonilo; metilación de los grupos aminos alfa de lisina, arginina e histidina; acetilación del amino N-terminal; metilación de los residuos de amida de la cadena principal o sustitución con aminoácidos –metil; o amidación de grupos carboxilos C-terminales.

Un residuo, por ejemplo, un aminoácido, de un polipéptido de la invención, también puede ser reemplazado por un aminoácido (o residuo de péptido mimético) de quiralidad opuesta. De esta manera, cualquier aminoácido que ocurre naturalmente en la configuración L (que también puede ser referido como la R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química), puede ser reemplazado con el aminoácido del mismo tipo estructural o un péptido mimético, pero de quiralidad opuesta, referido como el aminoácido D, pero que también puede ser referido como la forma-S o -R.

La invención también proporciona métodos para modificar los polipéptidos de la invención por procesos naturales, tales como el procesamiento post-translacional (por ejemplo, fosforilación, acilación, etc), o por medio de técnicas químicas de modificación. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte en el polipéptido, incluyendo la red troncal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Será apreciado que el

mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o en grados variantes, en varios sitios, en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede tener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, PEGilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de la porción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de un fosfatidilinositol, ciclización entre lazadora, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrelazos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de ancla GPI, hidroxilación, iodinación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, y adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tal como arginilación. Ver, por ejemplo, Creighton, T. E., *Proteins—Structure and Molecular Properties* 2nd Ed. W. H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983).

También pueden ser utilizados para sintetizar el polipéptido o fragmentos de la invención, métodos de síntesis química en fase sólida de péptidos. Tales métodos han sido conocidos en el estado de la técnica desde inicios de 1960 (Merrifield, R. B., "*Solid-phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide*", *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (ver también Stewart, J.M. and Young, J.D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12)) y han sido empleados recientemente en el diseño de péptidos de laboratorio y kits de síntesis que se encuentran disponibles comercialmente (Cambridge Research Biochemicals). Tales kits de laboratorio disponibles comercialmente han utilizado generalmente las enseñanzas de H. M. Geysen et al., "*Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid*", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998 (1984) y se proporcionan para sintetizar péptidos sobre la punta de una multitud de "barras" o "pines", todos los cuales se encuentran conectados a una placa única. Cuando se utiliza un sistema así, una placa de barras o pines es invertida e insertada en una segunda placa de pocillos o reservorios correspondientes, que contienen soluciones para unir o anclar un aminoácido apropiado a la punta del pin o barra. Por medio de la repetición de tal paso del proceso, es decir, invertir e insertar las puntas de las barras y los pines en soluciones apropiadas, los aminoácidos son armados en los péptidos deseados. Además, se encuentra disponible un número de sistemas de síntesis de péptidos FMOC disponibles. Por ejemplo, el armado de un polipéptido o fragmento puede llevarse a cabo en un soporte sólido usando un sintetizador de péptidos automatizado Applied Biosystems, Inc. modelo 431A®. Tal equipo proporciona acceso rápido a los péptidos de la invención, ya sea por síntesis directa o por síntesis de una serie de fragmentos que pueden ser acoplados usando otras técnicas conocidas.

El polipéptido sintético o fragmento del mismo puede ser recuperado y purificado por métodos conocidos, que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de anión o catión, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Pueden ser utilizadas etapas de re plegamiento de proteína, según sea necesario, para completar la configuración del polipéptido. Si es deseado, puede ser empleada cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), para los pasos finales de purificación.

La invención proporciona la preparación o formulación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo que comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos, en donde la preparación es líquida o seca. La formulación de proteína incluye, opcionalmente, un búfer, cofactor, segunda o proteína adicional, o uno o más excipientes. En un aspecto, la formulación es utilizada como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo terapéutico condicionalmente activo, que es activo bajo condiciones aberrantes o no fisiológicas, pero menos activo o inactivo bajo condiciones fisiológicas normales de, por ejemplo, temperatura, pH, o presión osmótica, oxidación u osmolalidad.

Pueden ser empleadas técnicas de purificación estándar, para anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos sintéticos o recombinantes.

50

#### **SELECCIÓN DE MUTANTES PARA IDENTIFICAR MUTANTES REVERSIBLES O NO REVERSIBLES**

Se logra identificar las moléculas deseables, de manera más directa, midiendo la actividad de unión, en la condición aberrante y la condición fisiológica normal. Los mutantes con mayor razón de actividad (aberrante/fisiológica normal) pueden ser luego seleccionados y son generadas permutaciones de las mutaciones puntuales, por medio de la combinación de las mutaciones individuales, usando métodos estándares. La biblioteca de proteína de permutación combinada es luego revisada para seleccionar aquellas proteínas que muestran la mayor actividad diferencial entre la condición aberrante y fisiológica normal.

La actividad de sobrenadantes puede ser seleccionada usando una variedad de métodos, por ejemplo, usando ensayos de actividad de alto rendimiento, tales como ensayos de fluorescencia, para identificar proteínas mutantes que son sensibles a cualquier característica que uno desee (temperatura, pH, etc.). Por ejemplo, para revisar para mutantes temporalmente sensibles, la actividad de anticuerpo de cada mutante individual es determinada a 5 temperaturas más bajas (tal como, 25 grados Celsius), y a temperaturas donde la proteína original funciona (tal como, 37 grados Celsius), usando sustratos disponibles comercialmente. Las reacciones pueden ser llevadas a cabo, inicialmente, en un formato de ensayo de múltiples pocillos, tal como un ensayo de 96 pocillos, y pueden ser confirmadas usando un formato diferente, tal como un formato de tubo de 14 ml.

10 En un aspecto, el método, además, comprende modificar al menos uno de los ácidos nucleicos o polipéptidos antes de testear los candidatos por actividad condicional. En otro aspecto, el testeo de la etapa (c), además, comprende testear por expresión mejorada del polipéptido en una célula huésped o un organismo huésped. La concentración de electrolitos a ser testeada, es seleccionada de entre una de la concentración de calcio, sodio, potasio, magnesio, cloruro, bicarbonato y fosfato.

15

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo purificado que se une específicamente al polipéptido de la invención o un fragmento del mismo, que tiene actividad de enzima. En un aspecto, la invención proporciona un fragmento del anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad de enzima.

## 20 **Métodos de Selección de Anticuerpos y Basados en Anticuerpos**

La invención proporciona anticuerpos aislados o recombinantes, que se unen específicamente a una enzima de la invención. Estos anticuerpos pueden ser utilizados para aislar, identificar o cuantificar las enzimas de la invención o polipéptidos relacionados. Estos anticuerpos pueden ser utilizados para aislar otros polipéptidos dentro del alcance 25 de la invención u otras enzimas relacionadas. Los anticuerpos pueden ser diseñados para unirse a un sitio activo de una enzima. De esta manera, la invención proporciona métodos de inhibición de enzimas usando los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos pueden ser utilizados en inmunosupresión, tinción, columnas de inmuno afinidad y similares. Si es 30 deseado, las secuencias de ácido nucleico que codifican para antígenos específicos pueden ser generadas por inmunización, seguida de aislación del péptido o el ácido nucleico, amplificación o la clonación e inmovilización del polipéptido con arreglo a la invención. Alternativamente, los métodos de la invención pueden ser utilizados para modificar la estructura de un anticuerpo producido por una célula, para ser modificada, por ejemplo, la afinidad de un anticuerpo, que puede ser aumentada o reducida. Además, la habilidad de crear o modificar anticuerpos puede ser 35 un fenotipo introducido por ingeniería a una célula por los métodos de la invención.

Los métodos de inmunización, producir y aislar anticuerpos (policlonales y monoclonales) son conocidos para aquellos expertos en la materia y descritos en la literatura científica y de patentes, ver, por ejemplo, Coligan, 40 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2ª ed.) Academic Press, New York, N.Y. (1986); Kohler (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature 256:495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York. Los anticuerpos también pueden ser generados in vitro, por ejemplo, usando sitios de unión de anticuerpo recombinante que expresan 45 bibliotecas de expresión en fago, además de los métodos in vivo tradicionales usando animales. Ver, por ejemplo, Hoogenboom (1997) "Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies", Trends Biotechnol. 15:62-70; y Katz (1997) "Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display", Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 27-45.

50 Los polipéptidos o péptidos pueden ser utilizados para generar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos, por ejemplo, las enzimas, de la invención. Los anticuerpos resultantes pueden ser utilizados en procedimientos cromatográficos de inmuno afinidad, para aislar o purificar el polipéptido o para determinar si el polipéptido se encuentra presente en una muestra biológica. En dichos procedimientos, una preparación de proteína, tal como un extracto, o una muestra biológica, es puesta en contacto con un anticuerpo capaz de unirse 55 específicamente a uno de los polipéptidos de la invención.

En procedimientos de inmuno afinidad, el anticuerpo es unido a un soporte sólido, tal como una micro esfera u otra matriz de columna. La preparación de proteína es puesta en contacto con el anticuerpo bajo las condiciones en que el anticuerpo se une específicamente a uno de los polipéptidos de la invención. Luego de un lavado para remover

las proteínas unidas de manera no específica, los polipéptidos unidos específicamente son eludidos.

La habilidad de las proteínas en una muestra biológica de unirse al anticuerpo puede ser determinada usando cualquiera de una variedad de procedimientos familiares para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la unión puede ser determinada por medio del etiquetado del anticuerpo con una etiqueta detectable, tal como un agente fluorescente, una etiqueta enzimática, o un radio isótopo. Alternativamente, la unión del anticuerpo a la muestra puede ser detectada usando un anticuerpo secundario que tiene tal etiqueta detectable sobre el mismo. Los ensayos particulares incluyen ensayos de ELISA, sándwich de ensayo, ensayos radioinmunológicos, y Western Blots.

10 Los anticuerpos policlonales generados contra los polipéptidos de la invención pueden ser obtenidos por inyección directa de los polipéptidos a un animal o por la administración de los polipéptidos a un animal no humano. El anticuerpo obtenido luego unirá el polipéptido por su cuenta. De esta manera, hasta una secuencia que codifica solamente un fragmento del polipéptido puede ser utilizada para generar anticuerpos que podrían unirse al polipéptido nativo completo. Dichos anticuerpos podrán luego ser usados para aislar el polipéptido de células que expresan dicho polipéptido.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede ser utilizada cualquier técnica que proporciona anticuerpos producidos por cultivos celulares de líneas continuas. Ejemplos incluyen la técnica de hibridoma, la técnica de trioma, la técnica del hibridoma de célula B humana y la técnica EBV-hibridoma (ver, por ejemplo, Cole (1985) en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (ver, por ejemplo, el documento de patente U.S. No. 4.946.778) pueden ser adaptadas para producir anticuerpos de cadena única a los polipéptidos de la invención. Alternativamente, pueden ser utilizados ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados a estos polipéptidos o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados en la selección de polipéptidos similares (por ejemplo, enzimas) de otros organismos y muestras. En tales técnicas, los polipéptidos del organismo son puestos en contacto con el anticuerpo y son detectados aquellos polipéptidos que se unen específicamente al anticuerpo. Cualquiera de los procedimientos descritos arriba puede ser utilizado para detectar la unión de anticuerpo.

30

#### **Metodologías de Selección y Dispositivos de Monitoreo “En Línea”**

Al poner en práctica practicar los métodos de la invención, pueden ser utilizados una variedad de aparatos y metodologías, en conjunto con los polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, para seleccionar polipéptidos por actividad de unión, para seleccionar compuestos como moduladores potenciales, por ejemplo, por anticuerpos, que se unen a un polipéptido de la invención, por ácidos nucleicos que hibridan a un ácido nucleico de la invención, para seleccionar células que expresan un polipéptido de la invención y similares.

#### **Arreglos o “Biochips”**

40

Los ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención pueden ser inmovilizados a o aplicados a un arreglo. Los arreglos pueden ser usados para seleccionar o monitorear bibliotecas de composiciones (por ejemplo, moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) por su habilidad de unirse a o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido de la invención. Por ejemplo, en un aspecto de la invención, un parámetro monitoreado es la expresión de transcripción de un gen de anticuerpo. Una o más, de todas las transcripciones de una célula pueden ser medidas por hibridación de una muestra que comprende transcripciones de la célula o ácidos nucleicos representativos de o complementarios a las transcripciones de una célula, por hibridación a ácidos nucleicos inmovilizados sobre un arreglo o “biochip.” Al usar un “arreglo” de ácidos nucleicos en un microchip, algunas o todas las transcripciones de una célula pueden ser cuantificadas simultáneamente. Alternativamente, también pueden ser utilizados arreglos que comprenden ácido nucleico genómico, para determinar el genotipo de una hebra producida recientemente por ingeniería, creada por los métodos de la invención. Los “arreglos” de polipéptidos también pueden ser realizados con cualquier “arreglo” conocido, también referido como un “micro arreglo” o “arreglo de ácido nucleico” o “arreglos de polipéptido” o “arreglo de anticuerpo” o “biochip”, o una variación de los mismos. Los arreglos son, genéricamente, una pluralidad de “puntos” o “elementos objetivos”, cada elemento objetivo comprendido por una cantidad definida de una o más moléculas biológicas, por ejemplo, oligonucleótidos, inmovilizados sobre un área definida de superficie de sustrato, para su unión específica a una molécula de muestra, por ejemplo, transcripciones de ARNm.

Al practicar los métodos de la invención, cualquier arreglo conocido y/o método de crear y usar arreglos o

variaciones de los mismos, como es descrito, por ejemplo, en los documentos de patente U.S. Números 6.277.628; 6.277.489; 6.261.776; 6.258.606; 6.054.270; 6.048.695; 6.045.996; 6.022.963; 6.013.440; 5.965.452; 5.959.098; 5.856.174; 5.830.645; 5.770.456; 5.632.957; 5.556.732; 5.143.854; 5.807.522; 5.800.992; 5.744.305; 5.700.637; 5.556.752; 5.434.049; ver también, por ejemplo, los documentos de patente WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; ver también, por ejemplo, Johnston (1998) "Gene chips: Array of hope for understanding gene regulation", Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) "Inexpensive Handheld Device for the Construction of High-Density Nucleic Acid Arrays", Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) "Direct hybridization of large-insert genomic clones on high-density gridded cDNA filter arrays", Biotechniques 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) "Matrix-Based Comparative Genomix Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances", Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) "Options Available—From Start to Finish—for Obtaining Expression Data by Microarray", Nature Genetics Supp. 21:25-32. Ver también la solicitudes de patente publicadas U.S. Nos. 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

### Arreglos Capilares

15

Los arreglos capilares, tales como el GIGAMATRIX® Diversa Corporation, San Diego, Calif., pueden ser utilizados en los métodos de la invención. Los ácidos nucleicos o los polipéptidos de la invención pueden ser inmovilizados a o aplicados a un arreglo, incluyendo arreglos capilares. Los arreglos pueden ser usados para seleccionar o monitorear bibliotecas de composiciones (por ejemplo, moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.), por su habilidad para unirse a o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido de la invención. Los arreglos capilares proporcionan otro sistema para mantener y seleccionar muestras. Por ejemplo, un aparato de selección de muestras puede incluir una pluralidad de capilares formados hacia un arreglo de capilares adyacentes, en donde cada capilar comprende, al menos, un lumen definidor de pared para retener una muestra. El aparato puede además incluir material intersticial dispuesto entre los capilares adyacentes en el arreglo, y uno o más indicios de referencia formados dentro del material intersticial. Un capilar para seleccionar una muestra, en donde el capilar es adaptado para ser unido en un arreglo de capilares, puede incluir una primera pared, que define un lumen para retener la muestra, y una segunda pared formado de un material filtrador, para filtrar la energía de excitación proporcionada al lumen para excitar la muestra. Un polipéptido o ácido nucleico, por ejemplo, una ligadura, puede ser introducido a un primer componente en al menos una porción de un capilar de un arreglo de capilar. Cada capilar del arreglo de capilar puede comprender al menos un lumen definidor de pared, para retener el primer componente. Una burbuja de aire puede ser introducida adentro del capilar, detrás del primer componente. Un segundo componente puede ser introducido adentro del capilar, en donde el segundo componente es separado del primer componente por la burbuja de aire. Una muestra de interés puede ser introducida como un primer líquido, etiquetado con una partícula detectable, adentro de un capilar de un arreglo de capilar, en donde cada capilar del arreglo de capilar comprende al menos una pared que define un lumen para retener el primer líquido y la partícula detectable, y en donde al menos una pared es recubierta con un material de unión para unir la partícula detectable a al menos una pared. El método puede, además, incluir remover el primer líquido del tubo capilar, en donde la partícula detectable unida es mantenida dentro del capilar, e introduciendo un segundo líquido dentro del tubo capilar. El arreglo de capilar puede incluir una pluralidad de capilares individuales, que comprenden, al menos, una pared externa que define un lumen. La pared externa del capilar puede ser una o más pared fusionadas juntas. Similarmente, la pared puede definir un lumen que es cilíndrico, cuadrado, hexagonal o cualquier otra forma geométrica mientras las paredes forman un lumen para la retención de un líquido o una muestra. Los capilares del arreglo de capilar pueden ser mantenidos juntos en proximidad cercana, para formar una estructura plana. Los capilares pueden ser unidos, por medio de fusión (por ejemplo, donde los capilares se encuentran hechos de vidrio), pegados, unidos, o sujetos uno al lado del otro. El arreglo de capilar puede ser formado por cualquier número de capilares individuales, por ejemplo, un rango de 100 a 4.000.000 capilares. Un arreglo de capilar puede formar una micro placa de titulación que tiene aproximadamente 100.000 o más capilares individuales unidos juntos.

### Composiciones Farmacéuticas

50

La presente invención proporciona al menos una composición que comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo; y (b) un vehículo o diluyente adecuado. La presente invención también proporciona, al menos, una composición que comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo que codifica ácido nucleico como se describe en la presente solicitud; y (b) un vehículo o diluyente adecuado. El vehículo o diluyente puede ser, opcionalmente, farmacéuticamente aceptable, con arreglo a los vehículos o diluyentes conocidos. La composición puede comprender, además, opcionalmente, al menos un compuesto, proteína o composición adicional.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos pueden estar en la forma de una sal

farmacéuticamente aceptable. Sales farmacéuticamente aceptables significa que pueden ser usados, generalmente, como sales de una proteína terapéutica en la industria farmacéutica, incluyendo, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y similares, y sales de amina de procaína, dibenzilamina, etilendiamina, etanolamina, metilglucamina, taurina, y similares, como también sales ácidas de adición tales como hidroclouros, y aminoácidos y similares.

5

La presente invención, además, proporciona, al menos, un método o composición de anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva para modular o tratar al menos una condición relacionada con una molécula pariente en una célula, un tejido, órgano, animal o paciente y/o, previo a, subsecuente a, o durante una condición relativa, como es conocido en el estado de la técnica y/o descrito en la presente solicitud. De esta manera, la invención proporciona un método para diagnosticar o tratar una condición asociada con el anticuerpo silvestre en una célula, un tejido, órgano o animal, que comprende contactar o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de, al menos, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo de la invención con, o a, la célula, el tejido, órgano o animal. El método puede, opcionalmente, además, comprender usar una cantidad efectiva de 0,001-50 mg/kilogramo de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo de la invención a las células, el tejido, órgano o animal. El método puede, opcionalmente, además, comprender usar contactar o administrar por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdermal. El método puede, opcionalmente, además, comprender administrar, previo, concurrentemente, o después del contacto o administración de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos, al menos una composición que comprende una cantidad efectiva de, al menos, un compuesto o proteína seleccionada de, al menos, uno de una etiqueta o un indicador detectable, un antagonista TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esterooidal (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobial, un antipsoriático, un cortico esteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco reemplazante de hormona, un radio farmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, un cito tóxico u otro agente anticancerígeno, un anti metabolito tal como metotrexato, o un agente anti proliferativo.

La presente invención además proporciona, al menos, un método de anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, para diagnosticar, al menos, una condición relacionada con un anticuerpo silvestre en una célula, un tejido, órgano, animal o paciente y/o, previo a, subsecuente a, o durante una condición relacionada, como es conocido en el estado de la técnica y/o descrito en la presente solicitud.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son determinados, en parte por las composiciones particulares que son administradas, como, también, por el método particular usado para administrar la composición. De forma correlativa, hay una gran variedad de formulaciones adecuadas a las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Pueden ser utilizados una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, salmuera neutralizada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia indeseada. Estas composiciones pueden ser esterilizadas por las técnicas de esterilización convencionales conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, como sea requerido, para aproximar a condiciones fisiológicas tales como ajuste de pH y agentes de neutralización, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos condicionalmente activos en estas formulaciones puede variar ampliamente, y será seleccionada basada en los volúmenes de fluido, viscosidades, masa corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

50

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva del ácido nucleico empacado suspendido en diluyentes, tales como agua, salmuera, o PEG 400; (b) cápsulas, sobres o tabletas, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de la sustancia activa, como líquidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la invención para administración oral pueden ser formuladas utilizando los vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en el estado de la técnica, en dosis apropiadas y adecuadas. Dichos vehículos permiten a los fármacos ser formulados en formas de dosificación unitarias como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, losange, geles, siropes, lechadas, suspensiones, etc., adecuados para su ingestión por parte del paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden ser formuladas

55

como un excipiente sólido, opcionalmente, moler una mezcla resultante y procesar la mezcla de gránulos, después de agregar los compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes sólidos adecuados son rellenos de carbohidrato o proteína que incluyen, por ejemplo, azúcares, incluyendo lactosa, sucrosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, u otras plantas; celulosa, tal como metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, o carboxi-metilcelulosa de sodio; y gomas, incluyendo arábica y de tragacanto; y proteínas, por ejemplo, gelatina y colágeno. Pueden ser agregados agentes desintegrantes o solubilizantes, tal como la pirrolidona polivinílica entrelazada, agar, ácido algínico, o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio. Las formas de tableta pueden incluir una o más de lactosa, sucrosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, tragacanto, celulosa micro cristalina, acacia, gelatina, dióxido de silicón coloidal, croscarmelosa de sodio, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, rellenos, aglutinantes, diluyentes, agentes de neutralización, agentes humectantes, preservantes, agentes saborizantes, tintes, agentes desintegrantes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona suspensiones acuosas que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, mezclado con excipientes adecuados para la manufactura de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia, y agentes de dispersión o de humedad, tales como fosfatada que ocurre naturalmente (por ejemplo, lecitina), un producto de la condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de la condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, oxicetanol de heptadecaetileno), un producto de la condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, polioxietileno sorbitol mono-oleato), o un producto de la condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, polioxietileno sorbitol mono-oleato). La suspensión acuosa también puede contener uno o más preservantes, tal como etilo o n-propilo p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes endulzantes, tal como sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones pueden ser ajustadas por osmolaridad.

Las formas losanges pueden comprender la sustancia activa en un sabor, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto, como también pastillas que comprenden la sustancia activa en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o emulsiones de sacarosa y acacia, geles, y similares que contienen además de la sustancia activa, vehículos conocidos en el estado de la técnica. Es reconocido que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, cuando es administrado oralmente, debe ser protegido de la digestión. Esto es típicamente logrado, ya sea por acomplejar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo con una composición para dejarlo resistente a hidrólisis enzimática y ácida, o empaquetando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo en un vehículo apropiadamente resistente, como un liposoma. Los medios para proteger proteínas de la digestión son conocidos en el estado de la técnica. Las composiciones farmacéuticas pueden ser encapsuladas, por ejemplo, en liposomas, o en una formulación que proporciona liberación lenta de la sustancia activa.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo empaquetado, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede ser transformado en formulaciones de aerosol (por ejemplo, pueden ser "nebulizados"), para ser administrados vía inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden ser colocadas en el interior de propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. Las formulaciones adecuadas para la administración rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en el ácido nucleico empaquetado con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas incluyen triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos parafina. Además, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación del ácido nucleico empaquetado con una base, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos líquidos, glicoles de polietileno, e hidrocarburos de parafina.

Las composiciones de entrega tópica o dérmica de la invención pueden incluir, además de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable en una crema, pomada, solución o formulación hidrogel, y otros compuestos, mientras que el componente adicionado no afecte perjudicialmente a la entrega de la proteína terapéutica. También pueden ser agregados emulsionantes, surfactantes, agentes de suspensión, antioxidantes, potenciadores osmóticos, extensores, diluyentes y preservantes convencionales, farmacéuticamente aceptables. También pueden ser utilizados como vehículos polímeros solubles en agua.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales como, por ejemplo, por intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradermal, intraperitoneal y rutas subcutáneas, incluyen acuosos y no

- acuosos, soluciones de inyección isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, neutralizantes, bacteriostáticos y solutos que rinden la formulación isotónica con la sangre del recipiente intencionado, y suspensiones acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores, y preservantes. En la práctica de ésta invención, las composiciones pueden ser administradas, por ejemplo, por infusión intravenosa, oralmente, tópicamente, intraperitonealmente, intravesicalmente o intratecalmente. En un aspecto, los modos parenterales de administración son los métodos preferidos de administración para composiciones que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo. Las composiciones pueden ser administradas convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden ser preparadas por cualquiera de los métodos conocidos en el arte farmacéutico, por ejemplo, como es descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. Easton Pa., 18<sup>th</sup> Ed., 1990. Las formulaciones para la administración intravenosa pueden contener un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua o salmuera esterilizada, glicoles de polialquilenos, tal como polietilén glicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. También ver y adaptar la descripción en la patente U.S. No. 4.318.905.
- 15 Las formulaciones de composiciones empaquetadas que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, pueden ser presentadas en contenedores sellados de dosis unitaria o de dosis múltiple, tales como ampollas y frascos. Las soluciones y suspensiones de inyección pueden ser preparados de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo previamente descrito.
- 20 La presente invención también proporciona al menos una composición, dispositivo y/o método de entrega de anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo, para el diagnóstico de al menos una condición relacionada con una proteína silvestre, de acuerdo a la presente invención.
- También se proporciona una composición que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo y al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición puede, opcionalmente, además, comprender una cantidad efectiva de, al menos, un compuesto o una proteína seleccionada de, al menos, uno de una etiqueta o un indicador detectable, un cito tóxico u otro agente anticancerígeno, un anti metabolito, tal como metotrexato, un agente anti proliferativo, una citoquina, o un antagonista de citoquina, un antagonista TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti inflamatorio no esteroideal (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobial, un antipsoriático, un cortico esteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco reemplazante de hormona, un radio farmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o un análogo.
- 35 También es proporcionado un dispositivo médico, que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo de la invención, en donde el dispositivo es adecuado para contactar o administrar dicho al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo por medio de al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdermal.
- 45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo de la invención en forma liofilizada en un primer recipiente, y un segundo recipiente opcional que comprende agua esterilizada, agua neutralizada esterilizada, o, al menos, un preservante seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio, alquilparaben, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal o mezclas de los mismos, en un diluyente acuoso. En un aspecto, en el kit, la concentración de anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo en el primer recipiente es reconstituido, a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml, hasta aproximadamente 500 mg/ml, con los contenidos de segundo recipiente. En otro aspecto, el segundo recipiente, además, comprende un agente de isotonicidad. En otro aspecto, el segundo recipiente, además, comprende un neutralizante fisiológicamente aceptable. En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar al menos una condición mediada por un anticuerpo silvestre, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una formulación proporcionada en un kit y reconstituida de forma previa a su administración.

También se proporciona un artículo de manufactura para uso farmacéutico humano o de diagnóstico, que

comprende material de empaque y un recipiente que comprende una solución o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo condicionalmente activo de la presente invención. El artículo de manufactura puede opcionalmente comprender tener el recipiente como un componente de un dispositivo o sistema de entrega parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, 5 intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdermal.

10 La presente invención además proporciona cualquier invención descrita en la presente solicitud.

**Ejemplo 1: Descripción General de un Ensayo Multipared (por ejemplo, ensayo de 96 pocillos) para Mutantes de Temperatura:**

15 Se agrega un sustrato fluorescente a cada pocillo de un plato multipared, tanto a temperaturas de reacción bajas silvestres y nuevas (por ejemplo, ya sea 37°C o 25°C como se menciona arriba), por un período de tiempo apropiado. La fluorescencia se detecta midiendo fluorescencia en un lector de fluorescencia de placa bajo la excitación apropiada y espectro de emisión (por ejemplo, excitación de 320 nm/emisión de 405 nm). Se determinan las unidades de fluorescencia relativa (RFU). Sobrenadante de molécula de tipo silvestre y células transformadas de 20 plásmido/vector son usadas como control positivo y negativo. Se llevan a cabo reacciones duplicadas por cada muestra, temperatura de reacción, y control positivo y negativo.

Los mutantes que son activos a la temperatura baja (por ejemplo, los mutantes activos a 25°C) y que tienen una reducción en actividad a la temperatura de tipo silvestre (por ejemplo, a el 10%, el 20%, el 30%, el 40% o mayor 25 reducción en su actividad a 37°C), de manera que tienen una razón de actividades mayor que o igual a aproximadamente 1,1 o más (por ejemplo, la razón de actividades a 25°C o 37°C (25°C/37°C) es mayor que o igual a 1,1 o más), pueden considerarse una opción primaria de hecho, sensible a la temperatura. Estas opciones primarias de hecho, sensibles a la temperatura, puede luego ser re seleccionadas, usando el mismo ensayo, para confirmar cualquier opción primaria.

30

**Ejemplo 2: Descripción General de un Formato de Ensayo Diferente para la Confirmación de Actividad (por ejemplo, un ensayo de 14-ml) para Mutantes de Temperatura:**

Los mutantes que son identificados como opciones primarias sensibles a la temperatura son expresados en tubos de 35 cultivo de 14 ml y su actividad enzimática es medida a temperatura de tipo silvestre (por ejemplo 37°C) y a temperatura más baja (por ejemplo, 25°C). La proteína es expresada y purificada como se describe arriba para el formato de multipared, con la excepción de que la expresión es llevada a cabo en un formato diferente (tubos de 14 ml) en vez del formato multipared (placa de 96 pocillos).

40 Cada mutante sobrenadante es transferido a una placa multipared, por ejemplo, una micro placa de 96 pocillos. El sustrato fluorescente es agregado a cada tubo a las temperaturas de reacción indicadas (silvestre, temperatura más baja), por un período de tiempo requerido. Las moléculas silvestres son usadas como un control negativo. La fluorescencia es detectada por medio de la medición de fluorescencia, en un lector de fluorescencia de placa al espectro de emisión apropiado (por ejemplo, excitación de 320 nm/emisión de 405 nm). Se determinan las unidades 45 de fluorescencia relativa (RFU). Se llevan a cabo reacciones duplicadas por cada muestra, temperatura de reacción, y control positivo y negativo.

Los mutantes que son activos a las temperaturas más bajas (por ejemplo, 25°C), pero que demuestran al menos un 30% o más de reducción de actividad a tipo silvestre (por ejemplo, 37°C), de manera que tienen una razón de 50 actividad a temperatura más baja (por ejemplo, 25°C) a temperatura de tipo silvestre (por ejemplo, 37°C) igual a o mayor que 1,5, son identificadas como opciones sensibles a la temperatura.

Las actividades de mutantes a la temperatura más baja (por ejemplo, 25°C), son comparadas con la actividad de la molécula silvestre a la temperatura silvestre (por ejemplo, 37°C). Si las moléculas son más activas que las moléculas 55 silvestres a la temperatura más baja (por ejemplo, 25°C), como es indicado por una actividad residual > 1, preferentemente 2 o mayor que 2, y si los mutantes demuestran una reducción global de la actividad cuando son comparados con la molécula silvestre a la temperatura silvestre (37°C), puede ser confirmado el fenotipo de los mutantes, como mutantes sensibles a la temperatura.

**Ejemplo 3: Descripción General de Mayor Evolución de las Opciones Descubiertas:**

Si se desea una nueva biblioteca de variantes combinatorios se genera de todas las o las seleccionadas opciones de mutantes previamente identificadas. La nueva biblioteca puede ser diseñada para contener todas las posibles 5 combinaciones de variantes de aminoácidos por cada uno de los mutantes seleccionados, y re seleccionada como se describe para nuevas opciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar un anticuerpo condicionalmente activo, comprendiendo el método:
  - 5 i. seleccionar un anticuerpo de tipo silvestre para un antígeno;
  - ii. desarrollar el ADN que codifica el anticuerpo de tipo silvestre usando una o más técnicas evolutivas para crear un ADN mutante;
  - iii. expresar el ADN mutante para obtener un anticuerpo mutante;
  - 10 iv. someter el anticuerpo mutante y el anticuerpo de tipo silvestre a un ensayo en una condición fisiológica normal, que está dentro de un intervalo normal de la condición fisiológica en un sitio de administración del anticuerpo condicionalmente activo a un sujeto, o en un tejido u órgano en un sitio de acción del anticuerpo condicionalmente activo de un sujeto, y a un ensayo bajo una condición aberrante, que se desvía del rango normal de la condición fisiológica en el sitio de administración del anticuerpo condicionalmente activo o en el tejido u órgano en el sitio de acción del anticuerpo condicionalmente activo, en donde la condición fisiológica normal y la condición aberrante son una misma condición seleccionada de temperatura, pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos; y
  - 15 v. seleccionar el anticuerpo condicionalmente activo de entre aquellos anticuerpos mutantes que presentan tanto (a) una disminución en la actividad en el ensayo en la condición fisiológica normal en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre, y (b) un aumento en la actividad en el ensayo en la condición aberrante en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la condición fisiológica normal se selecciona de uno o más de la temperatura fisiológica normal, pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos.  
25
3. El método de la reivindicación 1, en el que la condición fisiológica normal es la temperatura; y en el que el anticuerpo condicionalmente activo es sustancialmente inactivo a la temperatura fisiológica normal, y es activo a una temperatura aberrante menor que la temperatura fisiológica normal.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más técnicas evolutivas incluyen mutagénesis de saturación de sitio.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la condición fisiológica normal es el pH.
- 35 6. Un método para preparar un modificador de respuesta biológica condicionalmente activo, comprendiendo el método:
  - a. seleccionar un mediador de respuesta inflamatoria;
  - 40 b. identificar un anticuerpo de tipo silvestre para el mediador;
  - c. desarrollar el anticuerpo de tipo silvestre;
  - d. cribar diferencialmente para determinar mutantes que presentan una unión disminuida al mediador con respecto al anticuerpo de tipo silvestre en una primera condición, y que presentan una afinidad de unión aumentada al mediador en relación con el anticuerpo de tipo silvestre en una segunda condición para identificar supermutantes; y
  - 45 e. recombinar las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de los supermutantes para crear supermutantes recombinados; y
  - f. cribar los supermutantes recombinados para determinar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que presenta una unión disminuida al mediador en relación con el anticuerpo de tipo silvestre en la primera condición, y que muestran una afinidad de unión aumentada al mediador en relación con el anticuerpo de tipo silvestre en la segunda condición para identificar el modificador de respuesta biológica condicionalmente activo.
  - 50
7. El método de la reivindicación 6, en el que el mediador de respuesta inflamatoria se selecciona de IL-6, receptor de IL-6, TNF-alfa, IL-23 e IL-12.  
55
8. El método de la reivindicación 6, en el que la primera y la segunda condición se seleccionan cada una de condiciones de pH, presión osmótica, osmolalidad, oxidación y concentración de electrolitos.
9. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo de tipo silvestre al mediador es un fragmento

de anticuerpo activo.

10. El método de la reivindicación 6, en el que la condición fisiológica normal se selecciona de pH y temperatura.