



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 724**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05791017 .6**

96 Fecha de presentación : **07.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1800133**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Métodos para cribar bancos de anticuerpos.**

30 Prioridad: **08.10.2004 GB 0422431**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.05.2011**

73 Titular/es: **AFFITECH RESEARCH AS.  
Oslo Research Park Gaustadalléen 21  
0349 Oslo, NO**

72 Inventor/es:  
**Stassar, Marike, Josée, Janneke, Gertrud y  
Reiersen, Herald**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 724 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).

## DESCRIPCION

Esta invención se refiere a un método de cribar una genoteca de expresión en fagos, para identificar o seleccionar uno o más de sus miembros que son parejas de unión candidatas para una o más entidades dianas, en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que se une a una fase sólida. La invención se refiere además a un método mejorado de separar las parejas de unión candidatas para dichas entidades dianas de otros miembros de la genoteca.

La tecnología de expresión de anticuerpos en fagos ha demostrado ser una técnica muy adecuada para el cribado y la selección de anticuerpos para antígenos dianas definidos (para una revisión véase Hoogenboom et al., 1998, *Immunotechnol.*, 4:1-20). La mayoría de las estrategias se han basado en la disponibilidad de antígenos purificados y/o recombinantes, que han sido cribados después de la inmovilización sobre un soporte sólido.

Sondar la diversidad de superficies celulares e identificar las parejas de unión para moléculas de la superficie celular específicas para ciertos tipos de células o estados relacionados con enfermedades es la propuesta más prometedora para el desarrollo de terapias dianas (es decir, dirigidas a dianas). Sin embargo, la identificación de dichas parejas de unión son frecuentemente experimentos que suponen un gran reto.

Los métodos convencionales para la identificación de parejas de unión para moléculas de la superficie celular se basan en la incubación de células en suspensión o cultivo con genotecas de fragmentos monocatenarios variables de anticuerpos (abreviadamente en lo sucesivo scFv por la expresión inglesa *single-chain variable fragments*) complejos de expresión en fagos seguido por diversos lavados (usualmente 5 o más) y elución ácida o alcalina de los fagos unidos (véase por ejemplo Hoogenboom et al., 1999, *Eur. J. Biochem.*, 260: 774-784; Ridgeway et al., 1999, *Cancer Research*, 59: 2718-2723; Wong et al., 2001, *Cancer Immunol. Immunother.*, 50: 93-101). Esto va precedido frecuentemente por la eliminación de las parejas de unión irrelevantes mediante rondas de cribados (denominadas en inglés *panning*) negativas sobre los tipos de células irrelevantes. Un método muy recientemente desarrollado y de una producción más alta es el cribado de células con una genoteca de expresión en fagos después de la inmovilización de las células sobre membranas de nitrocelulosa (Radosevic et al., 2003, *J. Immunol. Métodos*, 272:219-233).

Una propuesta alternativa y que ahorra tiempo respecto a la propuesta convencional para el cribado, selección y clasificación de péptidos que se unen a la superficie celular usando una genoteca de expresión en fagos ha sido descrita por Giordano et al., y se denomina el método BRASIL [(por la expresión inglesa *Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*, 2001), *Nature Med.*, 11: 249-1253]]. Este método se basa en una separación de la fase orgánica, en una sola etapa, de fagos libres y unidos a células que tiene la ventaja de que se evitan las etapas de lavado esenciales del método convencional (es decir, las etapas en las cuales los fagos libres son eliminados de las células por lavado), que implican un trabajo intenso e ineficaz y da como resultado que se pierdan células y ligandos potenciales.

Sorprendentemente se ha encontrado ahora que, contrariamente a las enseñanzas del método BRASIL, un método significativamente mejorado para el cribado, selección e identificación de parejas de unión para moléculas de la superficie celular, implica someter las células a al menos una etapa de lavado antes de la separación de la fase orgánica. El método descrito también muestra mejoras significativas sobre el método convencional de lavado y elución descrito anteriormente.

En su aspecto más general, la presente invención proporciona por tanto un método de cribar una genoteca de moléculas para identificar o seleccionar uno o más de sus miembros que son parejas de unión candidatas para una o más entidades dianas, que comprende:

- (a) poner en contacto una genoteca de expresión con una o más entidades dianas;
- (b) someter dichas entidades dianas a al menos una etapa de lavado;
- (c) separar las entidades dianas que han llegado a unirse a uno o más miembros de la genoteca de expresión de los miembros no unidos de la genoteca de expresión mediante separación a través de una fase orgánica, separando de este modo las parejas de unión candidatas para dichas entidades dianas de otros miembros de la genoteca, en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos y en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que se une a una fase sólida.

Considerada desde un punto de vista alternativo, la presente invención proporciona un método mejorado de separar de una genoteca de expresión parejas de unión candidatas que han llegado a unirse a una entidad diana de otros miembros de la genoteca no unidos, que comprende las etapas (a) a (c) como se han definen en la presente memoria, en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos y en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que se une a una fase sólida.

La genoteca de moléculas que han de ser cribadas de acuerdo con la presente invención es una genoteca de expresión de proteínas de una genoteca de expresión en fagos. Los ejemplos de genotecas de expresión son bien conocidos y descritos la técnica e incluyen genotecas de expresión, tales como genotecas de expresión en fagos (por ejemplo Winter et al., documento WO90/05144; McCafferty et al., documento WO92/01047), bacterias (por ejemplo, Samuelson et

al., 2002, *J. Biotechnol.* 96, 129-154), genotecas de visualización covalentes o no covalentes, tales como genotecas de expresión en ribosomas (por ejemplo, como las publicadas en el documento WO92/02536 de The Regents de the University de Colorado, WO93/03172 de University Research Corporation y el documento WO91/05058 de Kawasaki), o genotecas de PROfusión (Phylos, Inc.), en donde la proteína expresada está unida al mRNA que la codifica, o sistemas de expresión covalentes o no covalentes en los cuales la proteína expresada está unida al DNA que la codifica (por ejemplo, mediante un enlace covalente como en los sistemas descritos en el documento WO98/37186 de Actinova Ltd o mediante proteínas de acción cis en los sistemas de expresión cis, como los descritos en el documento WO04/022746), o sistemas de expresión en levaduras (por ejemplo, los descritos por Wittrup, K. D. et al., WO 99/36569; Wittrup, K. D. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 395-399; Lee, S. Y. et al., (2003) *Trends in Biotechnol.* 21, 45-52), o sistemas híbridos de dos bacterias (por ejemplo, Chien et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578). Se conocen tipos alternativos de genotecas de expresión, tales como genotecas de expresión bacterianas u otras genotecas, en donde las proteínas se expresan y secretan en forma de fragmentos solubles. Las quimiotecas también pueden ser cribadas, por ejemplo, quimiotecas de péptidos sintéticos. Las genotecas para uso en la presente son genotecas de expresión en fagos.

Las proteínas expresadas por la genoteca de expresión puede ser de cualquier longitud apropiada, siempre que dicha longitud sea suficiente para facilitar que actúe (o actúe potencialmente) como una pareja de unión para la entidad diana. Por tanto, dichas proteínas pueden ser péptidos lineales cortos (por ejemplo, de una longitud del orden de 5-50 o 7-30 aminoácidos), o péptidos o polipéptidos mayores que pueden estar plegados en lugar de estar en forma lineal. En contraste con el método BRASIL de la técnica anterior, como ha sido descrito por Giordano et al., *supra*, los métodos de la presente invención han demostrado ventajosamente ser útiles para cribar genotecas de expresión que comprenden polipéptidos más grandes, más específicamente genotecas de expresión de anticuerpos, en contraposición a genotecas de péptidos cortos.

Por tanto, las proteínas de la genoteca de expresión pueden ser codificadas por genes completos o sus fragmentos, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican los miembros de la genoteca de expresión pueden ser una genoteca de cDNA o mRNA o sus fragmentos, por ejemplo, generados a partir de un tipo de célula particular o puede ser una genoteca de DNA genómico o sus fragmentos.

Las genotecas de expresión preferidas expresan parejas de unión a polipéptidos que son ligandos candidatos, receptores, enzimas, sustratos, antígenos etc., o sus fragmentos, y especialmente las genotecas de expresión de fagos preferidas expresan moléculas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que luego pueden ser cribados para candidatos que se unen a uno o más antígenos dianas conocidos o desconocidos. Dichas genotecas de expresión de anticuerpos pueden expresar anticuerpos en cualquier forma apropiada y pueden comprender moléculas de anticuerpo completas o fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), Fab, Fv, Fab'2, dianticuerpos, anticuerpos biespecíficos, minianticuerpos, cadenas pesadas o cadenas ligeras, anticuerpos cameloides, tetra-anticuerpos, anticuerpos de un solo dominio, trianticuerpos, etc. Un formato preferido de fragmentos de anticuerpos son los fragmentos scFv.

Las moléculas o fragmentos de anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo Ig, tales como IgG, IgM o IgA y así sucesivamente, y las genotecas de expresión pueden comprender anticuerpos de uno o más de estos subtipos.

Muchas genotecas de anticuerpos son conocidas y están descritas en la técnica y cualquiera de ellas puede ser cribada usando los métodos de la invención.

Cuando en la presente memoria se hace referencia a una genoteca de expresión, dicha frase se refiere a una genoteca al nivel de ácido nucleico o proteína, es decir, antes o después de que ha tenido lugar la expresión de las proteínas codificadas. Sin embargo, debe quedar claro que dichas genotecas de expresión deben estar presentes al nivel de proteínas para que tenga lugar la interacción con las entidades dianas.

Los métodos para construir dichas genotecas de expresión y los ácidos nucleicos que las codifican son bien conocidos y están descritos en la técnica y a este respecto se puede usar cualquier genoteca de expresión conocida o recientemente desarrollada. Por ejemplo, dichas genotecas pueden estar constituidas por polipéptidos que existen en la naturaleza o sus fragmentos o pueden ser totalmente o parcialmente aleatorias o sintéticas. Por ejemplo, en el caso de genotecas de expresión de anticuerpos, las genotecas pueden ser obtenidas clonando ácidos nucleicos a partir de una población indiferenciada de linfocitos procedentes de un donante sano (por ejemplo, como se describe en la patente EP-A-368684), o procedente de una población enriquecida de linfocitos, por ejemplo, linfocitos derivados de un paciente que ha estado expuesto a un antígeno o inmunizado con una vacuna, o por ejemplo, células tumorales (por ejemplo, como se describe en el documento WO03/095491 de Affitech AS), o partir de poblaciones de linfocitos que han sido enriquecidas por rondas de cribados sobre antígenos particulares.

Las genotecas de expresión y en particular las genotecas de expresión de anticuerpos se pueden obtener de cualquier fuente apropiada, preferiblemente de una fuente de mamífero, más preferiblemente una fuente humana. También se pueden usar genotecas de expresión, quiméricas o humanizadas. Las genotecas también pueden ser creadas eligiendo una plataforma de origen natural e incluyendo secuencias al azar en los lugares apropiados. Alternativamente, la plataforma puede estar basada en una o más secuencias de consenso derivadas de una variedad marcos que existen en la naturaleza.

Generalmente, las técnicas usadas para preparar las construcciones de genotecas estarán basadas en técnicas conocidas de ingeniería genética. A este respecto, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína o péptido real que ha de ser expresado en la genoteca de expresión, y que generalmente varían entre diferentes miembros de la genoteca, proporcionado con ello la diversidad de genotecas, se incorporan en vectores de expresión apropiados para el tipo de expresión en fagos del sistema expresión que se va de usar. Los vectores de expresión para uso en expresión en fagos son muy conocidos y están descritos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos de genotecas de expresión antes citados). La expresión en fagos es la genoteca de expresión de elección, de modo que se pueden usar bien sean fagos o vectores fagémidos, aunque se prefieren los vectores fagémidos.

Una vez que se han generado las moléculas de ácidos nucleicos que codifican miembros de genotecas diferentes (es decir, que codifican los péptidos que varían entre los miembros de la genoteca) pueden ser también diversificados antes del cribado, usando técnicas estándares, por ejemplo, por mutación que implica la adición, delección y/o sustitución de uno o más nucleótidos de un modo controlado (por ejemplo, mutagénesis dirigida a un sitio) o al azar, o por intercambio de dominios, mutagénesis de casetes, barajamiento de cadenas etc. Se pueden usar nucleótidos sintéticos en la generación de las diversas secuencias de ácidos nucleicos. Así, la totalidad o parte de los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de expresión puede ser sintetizada químicamente o ser obtenida a partir de diversos organismos o tipos de células.

Las construcciones de genotecas pueden contener adicionalmente otros componentes apropiados, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores inducibles o no inducibles para iniciar la transcripción, potenciadores, genes y marcadores de resistencia a antibióticos, etiquetas generales o moléculas indicadoras, sitios de unión a cebadores para facilitar la amplificación de las construcciones, por ejemplo, por PCR, u otros elementos de secuencias deseables. Las fuentes apropiadas y el posicionamiento de dichos componentes adicionales dentro de las construcciones de genotecas de modo que realicen sus funciones deseadas estarían dentro del conocimiento normal de un experto en la técnica.

La inclusión de moléculas marcadoras o indicadoras puede ser particularmente útil en las genotecas de expresión que se usan en la presente invención. Dichas moléculas marcadoras o indicadoras pueden ser directamente o indirectamente detectables e incluyen, por ejemplo, etiquetas de secuencias cortas que pueden ser reconocidas por un anticuerpo, marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes o marcadores que pueden ser detectados enzimáticamente. Otros marcadores que pueden ser usados incluyen una pareja de un par de unión, tal como estreptavidina:biotina. Dichos marcadores son típicamente marcadores generales que están presentes en todas las construcciones de genotecas y pueden ser usados para detectar la presencia de miembros de la genoteca. Además, la intensidad de la señal detectada se puede usar también para cuantificar la cantidad de un miembro de la genoteca particular presente. Dicha cuantificación de la cantidad de un miembro de la genoteca presente puede revelarse extremadamente útil en determinar la afinidad de una entidad diana para un miembro de la genoteca. Alternativamente o adicionalmente, si por ejemplo, uno o más de los ácidos nucleicos que completan las moléculas de la genoteca están marcados con marcadores diferentes o están inmovilizados sobre perlas inmovilizadas de diferentes tamaños o marcadas diferentemente, se puede obtener información sobre el contenido, por ejemplo, de la secuencia de las moléculas del ácido nucleico.

En realizaciones de la invención en donde los métodos de la invención se combinan con el método *AffiSelect* (véase más adelante) la inclusión de etiquetas o marcadores de tipo general en las construcciones de genoteca y en los miembros de genotecas expresados (parejas de unión candidatas) es particularmente importante y dichas etiquetas se usan para facilitar la unión de miembros de la genoteca (parejas de unión candidatas) a una fase sólida. De las etiquetas y marcadores apropiados se informa más adelante en la descripción del método *AffiSelect*.

La expresión "entidad diana" como se usa en la presente memoria se refiere a una entidad o molécula de interés a la cual se desea identificar una pareja de unión de una genoteca de expresión, y que se une a, o se asocia de algún modo, con un resto que se puede someter a separación a través de una fase orgánica, por ejemplo, un resto que progresará a través de, y se recogerá en el fondo de, una fase orgánica, cuando se aplican condiciones de separación apropiadas, preferiblemente una fuerza centrífuga. Dichas entidades dianas pueden ser moléculas conocidas o no conocidas para las cuales se desea identificar parejas de unión candidatas. El resto es una célula o una fase sólida.

Dichas entidades dianas también han de ser capaces de unirse o interactuar de otro modo con miembros de la genoteca de expresión de proteínas que se criba. Por tanto, dichas entidades dianas son entidades que son capaces de unirse a proteínas o péptidos y pueden ser proteínas/péptidos, glicopéptidos, carbohidratos, lípidos, glicolípidos, pequeñas moléculas, ácidos nucleicos, etc., unidos a una fase sólida o presentes en la superficie de una célula. La fase sólida o célula representa un resto apropiado que puede ser sometido a separación a través de una fase orgánica. Se prefiere una fase sólida en forma de partículas, tales como perlas. Por tanto, dichas entidades dianas pueden ser moléculas de la superficie celular unidas a, o que son componentes de, células enteras, o fracciones de membranas de células o moléculas, por ejemplo, moléculas libres, sin revestir, aisladas o purificadas, unidas a una fase sólida, o fracciones de la membrana celular unidas a una fase sólida. Las entidades dianas preferidas son proteínas o péptidos, por ejemplo, antígenos. Las entidades dianas más preferidas son moléculas de la superficie celular (es decir, moléculas presentes *in situ* en la superficie de células o fracciones de membranas de células), y en particular proteínas o péptidos de la superficie celular, por ejemplo, antígenos de la superficie celular.

En realizaciones de la invención en donde la entidad diana es una molécula unida a la superficie de una fase sólida entonces esta molécula puede proceder de cualquier fuente apropiada, es decir, puede ser una proteína, carbohidrato, lípido, glicolípido etc., de origen natural, que ha sido aislada o purificada de sus entornos naturales o puede ser una

molécula recombinante o sintética, por ejemplo, una proteína o péptido recombinante o una molécula sintetizada químicamente. A este respecto, los antígenos aislados, purificados o recombinantes son entidades dianas particularmente preferidas.

5 El término "célula" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier tipo de partícula biológica de interés que pueda ser separada a través de una fase orgánica. Por ejemplo, este término incluye células procariotas, tales como bacterias, virus (en particular partículas de virus agregadas, por ejemplo, partículas agregadas por anticuerpos o por modificación química, o partículas virales revestidas con preferencia para una fase orgánica en oposición a una fase acuosa), células eucariotas (incluyendo células eucariotas inferiores, tales como células de levaduras y células eucariotas superiores, tales como células de mamíferos, en particular células humanas). Las partículas biológicas que normalmente no son  
10 suficientemente densas para ser separadas a través de una fase orgánica generalmente se excluyen del término "célula" tal como se usa en la presente memoria. Los fragmentos de células también están incluidos dentro del ámbito de este término, por ejemplo, fracciones de membrana, fracciones de paredes celulares, proteínas de la pared celular, proteínas de membrana, etc., siempre que retengan o se les haya conferido la capacidad de ser separadas a través de una fase orgánica. (Por ejemplo en el caso de las proteínas de la pared celular y las proteínas de membrana, dichos fragmentos pueden ser  
15 necesarios para facilitar la separación a través de una fase orgánica).

Las células pueden ser células de origen natural o una mezcla de células (por ejemplo, células procedentes de una biopsia o alguna otra muestra de un sujeto mamífero), o líneas celulares (incluyendo células inmortalizadas y líneas celulares manipuladas por ingeniería genética, por ejemplo células transformadas o transfectadas con un ácido nucleico que codifica una entidad diana particular o una pluralidad de células transformadas o transfectadas con una genoteca de  
20 entidades dianas, por ejemplo, una genoteca de cDNA, las cuales entidades dianas se expresan luego en la superficie de las células), etc. Las genotecas preferidas de entidades dianas son genotecas producidas a partir de entidades asociadas a enfermedades, por ejemplo, células asociadas a enfermedades o agentes patológicos, tales como virus o bacterias. Una genoteca preferida particularmente es una genoteca de células tumorales o una genoteca de células virales (por ejemplo, una genoteca de c-DNA) para facilitar que sean identificadas parejas de unión candidatas a proteínas asociadas a tumores o a virus. Las células eucarióticas apropiadas (y otros tipos de células) para transfección, tal como por ejemplo las células COS, son bien conocidas y están descritas en la técnica y pueden usarse cualquiera de ellas. También se pueden usar las células que sobre-expresan dicha entidad diana.

Las "células" preferidas para uso en la presente invención son células eucariotas o sus fracciones de membrana. Las células especialmente preferidas son las que están asociadas a un estado morbozo, tal como por ejemplo células o  
30 líneas de células cancerosas, por ejemplo, células o líneas de células de cáncer de mama o cáncer de pulmón o linfocitos (por ejemplo, linfocitos de sangre periférica) de un paciente enfermo o células infectadas con un virus y que por tanto presentan proteínas virales en su superficie.

Las células que han de ser usadas en los métodos de la invención pueden proceder de cualquier fuente apropiada, por ejemplo, las células pueden proceder directamente de un sujeto mamífero o pueden obtenerse a partir de cultivos *in vitro*. Si se usa un cultivo *in vitro* entonces dichas células pueden ser cultivadas en suspensión o como monocapas y se  
35 pueden usar en los métodos de la invención en un estado vivo o fijado. Generalmente se prefiere que se usen células vivas porque entonces la entidad diana está presente en la superficie de la célula en su forma natural lo que significa que las parejas de unión candidatas seleccionadas reconocen entonces la entidad diana en su forma natural, aumentando con ello las probabilidades de que dichas parejas de unión candidatas sean de uso en terapia o diagnóstico. Generalmente se prefiere que en los métodos de la invención se usen células recientemente aisladas en lugar de células congeladas o conservadas. Sin embargo, también es posible realizar rondas de cribados en portaobjetos con tejidos y material congelado.  
40

En realizaciones de la invención en donde una entidad diana está unida a la superficie de una fase sólida, se puede usar cualquier fase sólida apropiada siempre que pueda ser separada a través de una fase orgánica. Una fase sólida de la densidad, tamaño y forma, apropiados para conseguir esto puede ser seleccionada fácilmente por una persona experta en la técnica. Sin embargo, puede verse que los soportes sólidos en forma de partículas serían particularmente preferidos para conseguir esto. Los soportes particularmente preferidos son perlas que opcionalmente pueden ser magnéticas o al menos magnetizables, por ejemplo, se pueden usar perlas de polímeros que llevan partículas super-paramagnéticas. Dichos soportes son bien conocidos y están documentados en la técnica y está dentro de la práctica normal de una persona experta seleccionar el soporte más apropiado para uso en los métodos de la invención.  
45

50 Los soportes en forma de partículas, por ejemplo, perlas son particularmente preferidos porque son fáciles de manipular *in vitro* y facilitan la automatización. Por ejemplo, si las perlas son magnéticas pueden ser separadas de una muestra por un campo magnético y luego lavadas. Alternativamente si las perlas están marcadas, por ejemplo, con una etiqueta o marcador fluorescente, las perlas pueden ser separadas mediante citometría de flujo. Las perlas marcadas, no marcadas y magnéticas adecuadas están disponibles comercialmente de Dyno Specialty Polymers AS de Liliestrøm, Noruega y Dynal Biotech ASA. Ejemplos particulares de perlas magnéticas que se pueden usar en los métodos descritos en la presente memoria son las perlas M-450, M-270 o M-280 de Dynal Biotech ASA, Noruega. Ejemplos particulares de perlas no magnéticas que se pueden usar en los métodos descritos en la presente memoria son micropérlas de metacrilato de glicidilo de 5 µm (Bangs Laboratories, Carmel, IN). Los métodos de unir las entidades dianas biomoleculares a fases sólidas son bien conocidos y están descritos en la técnica.  
55

"Una o más" como se usa en la presente memoria en relación con la expresión "entidad diana" se refiere a uno o más tipos distintos de entidad diana, por ejemplo, una o más moléculas o polipéptidos diferentes de la superficie celular. En otras palabras los métodos de la invención se pueden usar para cribar parejas de unión candidatas para una entidad diana o una pluralidad o genoteca de entidades dianas (por ejemplo, se pueden usar para cribado de genoteca *versus* genoteca lo que es particularmente ventajoso). Si en el cribado está implicada más de una entidad diana, estas pueden estar unidas o asociadas a los mismos o diferentes restos que pueden ser sometidos a separación a través de una fase orgánica. Por ejemplo, puede verse que si las entidades dianas son moléculas de la superficie celular unidas a células enteras o sus fracciones de membrana, entonces es probable que sean identificadas las parejas de unión candidatas para un número de diferentes moléculas de la superficie celular superficie (en otras palabras, este es un ejemplo de un caso en donde tiene lugar el cribado de parejas de unión candidatas para una genoteca de entidades dianas, es decir, es una forma de cribado genoteca *versus* genoteca). Naturalmente, si se desea, este método puede ser dirigido a la selección de parejas de unión candidatas para una molécula particular de la superficie celular, por ejemplo, en el caso de una célula que tenga una entidad diana inmunodominante, o seleccionando una célula que era conocida o había sido seleccionada para sobre-expresar la entidad diana de interés o había sido manipulada por ingeniería genética para sobre-expresar la entidad diana. Otros ejemplos de entidades dianas son genotecas de c-DNA tumoral u otras genotecas genéticas, transfectadas y expresadas en células, por ejemplo, una genoteca de c-DNA sustraída transfectada y expresada en células eucariotas.

Naturalmente cada entidad diana puede estar presente en múltiples copias en la reacción de reacción cribado (en realidad, esto se prefiere por lo general), por ejemplo, si la entidad diana es una molécula de la superficie celular entonces están preferiblemente presentes múltiples copias de dicha molécula, bien sea sobre la misma célula y/o sobre múltiples células del mismo tipo o de un tipo diferente.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, la genoteca de expresión es una genoteca de anticuerpos para expresión en fagos, y las entidades dianas son moléculas de la superficie celular (antígenos de la superficie celular). Dichos métodos de cribado de anticuerpos basados en células se denominan métodos CBAS (por sus iniciales en inglés (*Cell Based Antibody Selection*)).

La etapa de poner en contacto las entidades dianas con la genoteca de expresión, o viceversa, se puede realizar de cualquier modo apropiado en condiciones tales que las parejas de unión en la genoteca de expresión puedan interactuar con las entidades dianas que están presentes o unirse a ellas. Dichas condiciones variarán generalmente dependiendo de la naturaleza de la genoteca de expresión, la entidad diana y el resto con el cual se asocia la entidad diana. Sin embargo, las condiciones apropiadas para facilitar la unión se pueden determinar fácilmente por una persona experta en la técnica. Dicha etapa de "contacto" ocurrirá generalmente en solución o en un medio acuoso o en algún otro contexto tal que la mezcla genoteca de expresión-entidad diana será inmisible con la fase orgánica, puesto que esto facilitará la subsiguiente etapa de separación de la fase orgánica. Por tanto, si la entidad diana está presente sobre una célula que se cultiva en forma de monocapas o células que se obtienen de un sujeto mamífero, por ejemplo, procedente de un órgano o tejido de mamífero, entonces dichas células se cosechan generalmente y se suspenden de nuevo en un medio acuoso mediante técnicas apropiadas antes de ser puestas en contacto con la genoteca de expresión. Sin embargo, también es posible poner en contacto la genoteca de expresión con una monocapa de células, después de lo cual estas células pueden ser cosechadas y suspendidas de nuevo en un medio acuoso por métodos apropiados.

Las condiciones de "contacto" ilustrativas pueden comprender la incubación sobre hielo a 4°C durante entre 30 minutos y 4 horas. Alternativamente, es posible realizar la etapa de contacto a temperatura ambiente o 37°C y en algunos casos puede ser preferible. La mezcla genoteca de expresión-entidad diana puede ser sometida opcionalmente a balanceo, mezclamiento o rotación suaves. Además se pueden añadir otros reactivos apropiados, tales como agentes de bloqueo para reducir la unión no específica. Por ejemplo, se puede usar BSA al 1-4% u otro agente de bloqueo adecuado (por ejemplo, leche). Sin embargo, se apreciará que las condiciones de contacto pueden ser variadas y adaptadas por una persona experta en la técnica dependiendo del objeto del método de cribado. Por ejemplo, si se aumenta la temperatura de incubación, por ejemplo, hasta la temperatura ambiente, esto puede aumentar la posibilidad de identificar agentes de unión a un subconjunto diferente de entidades dianas, por ejemplo, agentes de unión a proteínas de la superficie celular que son fácilmente internalizados. De nuevo dichas adaptaciones a las condiciones están dentro del alcance de la persona experta.

El tamaño y complejidad de la genoteca de expresión que se ha de usar en los métodos de la presente invención pueden ser variados, dado el número total de copias de las entidades dianas incluidas en la etapa de contacto. Por ejemplo, se usa preferiblemente un título de fagos en la región de  $10^8$ - $10^{13}$ , más preferiblemente en la región de  $10^{11}$  fagos.

Convenientemente el número de copias de entidades diana puede ser variado alterando el número de restos presentes, con las que están asociadas las entidades dianas. Por ejemplo, la entidad diana es una molécula de la superficie celular, o un polipéptido etc., unidos a un soporte sólido, de modo que puede ser ajustado el número de entidades dianas aumentando o disminuyendo el número de células o soportes sólidos presentes en la mezcla de contacto o aumentando o disminuyendo el número de polipéptidos, etc., unidos a un soporte sólido individual. De nuevo, el número de entidades dianas requerido puede ser determinado fácilmente por prueba y error, pero por ejemplo, cuando la entidad diana es una molécula de la superficie celular, se pueden usar convenientemente  $10^5$  a  $10^7$  células.

La concentración apropiada de entidades dianas se podría determinar fácilmente por prueba y error, pero por ejemplo, cuando la entidad diana es una molécula de la superficie celular se podría usar convenientemente una concentración de  $1 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  células/ml.

Las etapas de lavado (b) se lleva cabo después de que las entidades dianas han estado en contacto con las genotecas de expresión en condiciones apropiadas, tales que haya ocurrido la unión/interactuación entre las entidades dianas y los miembros de la genoteca apropiados, pero antes de la separación de la fase orgánica. Es importante advertir que el método de cribado reivindicado no excluye las etapas de lavado adicionales que se llevan a cabo en otros momentos del proceso, por ejemplo, antes de la etapa (a), por ejemplo, en la preparación de las entidades dianas para contacto con la genoteca de expresión, o después de la etapa (c) por ejemplo, en el análisis posterior de las entidades dianas o los miembros de la genoteca de expresión. Sin embargo, están excluidos los métodos que no impliquen una etapa de lavado después de la etapa de contacto de la genoteca de expresión con las entidades dianas y antes de la separación de la fase orgánica (por ejemplo, el método BRASIL de Giordano et al., *supra*).

Las etapas de lavado se pueden llevar a cabo de cualquier modo apropiado dependiendo de la naturaleza de la entidad diana y del resto al que se una. Por ejemplo, si la entidad diana está unida a una célula o a una fracción de membrana de una célula, entonces dichos lavados tienen lugar convenientemente centrifugando la mezcla genoteca de expresión-entidad diana en condiciones tales que dichas células formen un sedimento, retirando el líquido sobrenadante, y volviendo a suspender luego dicho sedimento en un medio acuoso apropiado (por ejemplo, el mismo medio en el que se llevó a cabo la etapa de contacto). Dichas etapas de sedimentar células y suspenderlas de nuevo constituirían un lavado. Dichas condiciones también serían generalmente apropiadas para el lavado de las entidades dianas asociadas con una fase sólida en partículas. Sin embargo, si las entidades dianas estuvieran asociadas con, por ejemplo, una fase sólida magnética, entonces las etapas de lavado (b) podrían llevarse a cabo convenientemente aplicando un campo magnético al recipiente en el cual sea llevado a cabo la etapa de contacto, retirando el líquido sobrenadante y suspendiendo de nuevo la fase sólida en un medio acuoso apropiado. Los métodos apropiados de lavar fases sólidas en forma de partículas son bien conocidos por las personas expertas en la técnica. De nuevo dichas etapas de separación magnética y nueva puesta en suspensión constituirían una etapa de lavado.

En el método de la invención se lleva a cabo al menos una etapa de lavado (b), por ejemplo, pueden llevarse a cabo al menos 1, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 etapas de lavado. Preferiblemente se llevan a cabo menos de 5 etapas de lavado, es decir, se llevan a cabo en la etapa (b) preferiblemente 1, 2, 3 ó 4 etapas de lavado. Más preferiblemente se llevan a cabo en la etapa (b) del método 1 ó 2 ó 3 y especial y preferiblemente 2 etapas de lavado. Este número preferido de etapas de lavado tiene la ventaja adicional de que el método es todavía significativamente más rápido y menos laborioso que implica al menos cinco etapas de lavado.

Estas etapas de lavado darán como resultado la retirada de una proporción de miembros de la genoteca de expresión no unidos, es decir, los miembros que no han interactuado, o lo han hecho de un modo no específico, con una entidad diana. Una proporción adicional de los miembros de la genoteca de expresión no unidos será retirada en la etapa (c) del método, es decir, la etapa de separación de la fase orgánica.

Para facilitar la separación de la fase orgánica, después de las etapas de lavado (b) las entidades dianas contenidas en un medio polar apropiado, por ejemplo, un medio acuoso se ponen en contacto con una fase orgánica. Dicho medio acuoso puede ser superpuesto sobre la parte superior de la fase orgánica o la fase orgánica puede ser colocada sobre el medio acuoso. En el primer caso, cuando se centrifuga, se recogen las entidades dianas unidas y preferiblemente los sedimentos de la fase orgánica, mientras que los miembros de la genoteca no unidos permanecen en el medio acuoso. En el segundo caso, cuando se centrifuga, el medio acuoso que contiene los miembros de la genoteca de expresión no unidos pasa ascendiendo a través de la fase orgánica mientras que las entidades dianas unidas se recogen y el sedimento queda preferiblemente por debajo de la fase orgánica. Alternativamente, también es posible mezclar las dos fases, que se separan luego durante la centrifugación. Por tanto, se obtiene el mismo resultado.

La expresión "fase orgánica" como se usa en la presente memoria se refiere a una fase fluida que es no miscible con el agua u otros medios polares o medios acuosos. Las fases orgánicas adecuadas para uso en la invención son las que, cuando se someten a condiciones apropiadas, por ejemplo, centrifugación, permitirán la separación de los complejos entidad diana unida—miembros de la genoteca de expresión de los miembros de la genoteca de expresión no unidos, por ejemplo, permitiendo que los complejos entidad diana unida-miembro de la genoteca de expresión pasen a través, pero excluyendo los miembros no unidos de la genoteca de expresión, es decir, excluirán los miembros no complejados o libres de la genoteca de expresión. Por supuesto, cualquier sistema experimental no es perfecto al 100%. Por tanto, una fase orgánica apropiada es una que excluye una mayoría o una proporción significativa de miembros no unidos o que los excluya sustancialmente de la genoteca de expresión.

Además, se selecciona una fase orgánica apropiada de tal modo que cause una rotura o daño mínimo a las entidades dianas, los restos a los que están unidos, los miembros de la genoteca de expresión y la reacción de unión entre las entidades dianas y los miembros de la genoteca en la mezcla. Esto es particularmente el caso para las entidades dianas, los miembros de la genoteca de expresión y la reacción de unión entre los dos. Por ejemplo, una fase orgánica debe ser seleccionada de tal modo que dichos componentes sean adecuados para uso en cualesquiera etapas de análisis apropiadas realizadas posteriormente, una vez que se han recogido de la fase orgánica. Sin embargo, en general, con el fin de reducir al mínimo el efecto perjudicial que la fase orgánica podría tener en las biomoléculas de la mezcla, se mantiene generalmente en un mínimo el tiempo que las biomoléculas están en contacto con la fase orgánica.

Las fases orgánicas apropiadas para uso en los métodos reivindicados pueden ser determinadas por una persona experta en la técnica basándose en los requisitos funcionales anteriores. Los ejemplos de fases orgánicas que se pue-

den usar en los métodos reivindicados son basadas en ftalatos, tales como las estudiadas en el trabajo de Giordano et al., *supra*, por ejemplo, ftalato de dibutilo:ciclohexano (9:1 [v:v]) o ftalato de dibutilo:ftalato de diisooctilo (4:5 [v:v]), o un aceite inmisible en agua, tal como el aceite Versilube F50 (Alfa Chemicals Ltd., Woringham). Así, se puede usar un aceite inmisible en agua para separar los complejos genoteca de expresión-entidad diana (y en particular los complejos fago-entidad diana) de los miembros de la genoteca de expresión no unidos (y en particular las partículas de fagos no unidas).

La separación a través de la fase orgánica se lleva a cabo generalmente por centrifugación a una velocidad apropiada para sedimentar o al menos recoger las entidades dianas que han llegado a quedar unidas a uno o más miembros de la genoteca de expresión (las entidades dianas unidas) en la fase orgánica, mientras que la totalidad, o una proporción significativa, o la mayoría de los miembros de la genoteca de expresión no unidos permanecen en la fase acuosa. Las condiciones apropiadas de centrifugación para efectuar esta separación dependerán de la naturaleza de la entidad diana (y del resto al que están unidos), y la fase orgánica particular usada. Sin, embargo, cuando se usan células y moléculas de la superficie celular como entidades dianas entonces las condiciones ilustrativas son podrían ser centrifugación a 10000-11000 g durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente o 4°C.

Después de la etapa de separación (c) las entidades dianas unidas pueden ser recogidas de la fase orgánica y opcionalmente sometidas a un análisis posterior. Dicha etapa de recogida puede ser facilitada, si se desea, congelando la fase orgánica y retirando el sedimento que contiene las entidades dianas unidas, por ejemplo, cortando el tubo de centrifuga en el punto apropiado. Dicha etapa de congelación, seguida por una etapa de descongelación (en algún momento futuro después de que se han recogido las entidades dianas unidas), no tiene generalmente un efecto adverso sobre el análisis posterior de los complejos entidad diana unida-miembro de la genoteca de expresión. Sin embargo, se ha de recomendar que esta sea comprobada en experimentos adecuados antes de que dicha etapa se incluya en un método experimental.

Los métodos de la presente invención pueden implicar más etapas adicionales. Por ejemplo, la genoteca de expresión puede ser sometida a rondas previas de cribados para eliminar algunos miembros de la genoteca de expresión no deseados o reducir la complejidad de la genoteca, poniendo en contacto la genoteca de expresión con una o más entidades (no dianas) no relevantes, por ejemplo, entidades biomoleculares no dianas, o células que no son de interés, antes de que la genoteca de expresión sea puesta en contacto con las entidades dianas en la etapa (a) del método. Dichas rondas previas de cribados también se denomina "rondas de cribados negativas". Por ejemplo la genoteca de expresión puede ser sometida a rondas previas de cribados con células, o sus fracciones de membrana, que no son de interés, por ejemplo, que no expresan las entidades dianas deseadas de interés o expresa las entidades dianas a un nivel bajo. Por ejemplo, si el método se diseña para identificar los miembros de la genoteca de expresión que se unen a un tipo particular de células de cáncer, las rondas previas de cribados se pueden realizar poniendo en contacto los miembros de la genoteca de expresión con un tipo de células diferentes o irrelevantes, por ejemplo, un tipo diferente de célula tumoral o célula no tumoral, tal como linfocitos o células endoteliales u otras células que no son de interés. El objeto de dichas etapas de rondas previas de cribados es eliminar una proporción de miembros de la genoteca de expresión que no se unirán a las entidades dianas de interés. Dichas etapas de rondas previas de cribados son etapas adicionales a la etapas (a), (b) y (c) del método y por tanto las etapas (a), (b) y (c) del método reivindicado no abarcan dichas etapas de rondas previas de cribados. Dichas etapas de rondas previas de cribados se pueden llevar a cabo mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, por ejemplo por el método convencional o incluso el método BRASIL descrito anteriormente. Sin embargo, preferiblemente las etapas de rondas previas de cribados se llevarán a cabo usando las etapas (a), (b) y (c) como se han definido antes, excepto que en la etapa (a) la genoteca de expresión se pone en contacto con entidades (no dianas) no relevantes y son los miembros de la genoteca de expresión no unidos los que deben ser retenidos. Por tanto, los líquidos sobrenadantes de cualesquiera etapas de lavado (b) deben ser retenidos en lugar de desechados y en la etapa de separación (c) son retenidos los miembros de la genoteca no unidos que no han sido separados a través de la fase orgánica. Esta genoteca de expresión empobrecida puede ser sometida luego al método de la invención.

Se pueden efectuar una o más rondas previas de cribados sobre las mismas o diferentes entidades no relevantes.

Las etapas (a) a (c) del método de la invención pueden ser consideradas como constitutivas de una ronda de cribado de entidades dianas frente a los miembros de la genoteca de expresión. Aunque después de la etapa de separación (c) en la primera ronda de cribado, las entidades dianas unidas pueden ser recogidas de la fase orgánica y opcionalmente sometidas a un análisis posterior, sin embargo, generalmente con el fin de reducir más la complejidad de la genoteca de expresión y obtener una población adecuadamente enriquecida de parejas de unión candidatas para dichas entidades dianas, se pueden llevar a cabo una o más rondas de cribados adicionales para facilitar un análisis posterior más productivo y que consuma menos tiempo.

Más rondas de cribados generalmente implican tomar las entidades dianas unidas de la etapa (c) del método, separar, desprender, eluir o aislar los miembros de la genoteca de expresión de las entidades dianas (opcionalmente expandiendo o amplificando los miembros de la genoteca de expresión) y someter dichos miembros de la genoteca de expresión a una ronda más de etapas (a) a (c) del método. La genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos, de modo que es posible incubar los complejos entidad diana-fagos unidos con bacterias. Esto eluirá los fagos de la entidad diana e infectará las bacterias de modo que las partículas de fagos pueden ser amplificadas fácilmente, por ejemplo, para uso en la etapa (a) del método reivindicado.



Una persona experta puede determinar fácilmente el número de rondas de cribados, si son necesarias, que se requieren o se desean. La genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos, de modo que un sencillo ensayo ELISA policlonal de parejas de unión candidatas procedentes de la etapa (c) del método frente a la entidad diana puede dar una indicación de la proporción de candidatos positivos presentes y si se desea una ronda adicional de cribados. A este respecto, un aumento en la unión de (fagos) miembros de la genoteca a las entidades dianas (por ejemplo, proporcionadas en las células de interés) pero no a las entidades no dianas (por ejemplo, proporcionadas por células que no son de interés) (usadas como controles comparativos) puede ser suficiente para mostrar que han tenido lugar un número suficiente de rondas de cribados. Como cada ronda de cribados (es decir, cada repetición de etapas (a) a (c) del método) puede dar como resultado la pérdida de miembros de la genoteca de expresión, el número de rondas de cribados se mantiene generalmente en un mínimo. Realmente, esta es una ventaja más que los métodos mejorados descritos en la presente memoria tienen sobre el método BRASIL antes descrito y el método convencional basado solamente en etapas de lavado, como se ha mostrado en ensayos comparativos que puede obtenerse el enriquecimiento adecuado después de pocas rondas de cribado. Por ejemplo, en los ensayos descritos en la presente memoria el método mejorado de la presente invención mostró un enriquecimiento adecuado después de la ronda 2 de cribados frente a la ronda 3 (método convencional) o la ronda 4 (método BRASIL).

Por tanto, las etapas (a) a (c) del método pueden ser repetidas una o más veces, por ejemplo hasta 4 o 5 veces. Sin embargo, en realizaciones preferidas de la invención, solamente se llevan a cabo 1, 2 ó 3 rondas de cribados (es decir, 1, 2 ó 3 rondas de las etapas (a) a (c)) antes de que las parejas de unión candidatas y/o las entidades dianas sean sometidas a posteriores análisis.

Ensayos comparativos también muestran que el método modificado descrito en la presente memoria puede dar como resultado la identificación de un número aumentado de parejas de unión para dichas entidades dianas, es decir, puede dar como resultado la identificación de un número aumentado de clones positivos. Por ejemplo, después de 3 rondas de cribados, 41% de las parejas de unión candidatas seleccionadas por el método de la invención demostraron ser positivas para una entidad diana en comparación con 12% por el método BRASIL y 28% por el método convencional.

Por tanto, considerada desde un punto de vista alternativo, la presente invención proporciona un método mejorado para la identificación de parejas de unión para entidades dianas que comprende llevar a cabo una o más rondas de las etapas (a) a (c) como se han definido en la presente memoria, en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos y en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que está unida a una fase sólida.

Naturalmente, puede suceder que si la genoteca de expresión que es cribada inicialmente contiene relativamente pocos miembros o es, por ejemplo, una genoteca enriquecida, por ejemplo, es una genoteca de anticuerpos aislados de pacientes que han estado expuestos a un reto inmunológico como se describe en el documento WO03/095491, *supra*, entonces se pueden requerir más rondas de cribados. De nuevo, esto puede ser determinado fácilmente por una persona experta en la técnica, por ejemplo, usando los métodos como los descritos anteriormente.

Una vez que se han llevado a cabo más rondas de cribados apropiadas entonces las entidades dianas unidas se recogen de la fase orgánica de la etapa (c) y pueden ser sometidas a posteriores análisis o usos. Dichos análisis o usos posteriores requieren generalmente que las parejas de unión candidatas sean desprendidas, retiradas, aisladas o eluidas de las entidades dianas y preferiblemente las parejas de unión candidatas se expresan o producen en el aislamiento de dichas entidades dianas. Por tanto, los métodos de la presente invención pueden comprender una etapa opcional (d) en donde dichas parejas de unión candidatas se desprenden, retiran, eluyen o preferiblemente se aíslan de dichas entidades dianas, o se expresan o producen en el aislamiento de dichas entidades dianas. Por ejemplo en el caso en donde la genoteca de expresión es una genoteca de fagos y las entidades dianas son moléculas de la superficie celular, dichos análisis o usos posteriores implican generalmente el aislamiento de las parejas de unión candidatas por infección de bacterias y clonación del DNA que codifica la pareja de unión candidata en un vector de expresión adecuado. Dicha etapa de infección puede permitir también la amplificación de las parejas de unión candidatas.

Dichos análisis posteriores pueden implicar un análisis adicional de cualquiera o ambos de los miembros de la genoteca de expresión que se han unido a las entidades dianas (es decir, las parejas de unión candidatas) o las entidades dianas por sí mismas. Por tanto, los métodos de la invención permiten el cribado e identificación de tanto nuevos miembros de la genoteca de expresión (nuevas parejas de unión) como de nuevas entidades dianas, por ejemplo, nuevas moléculas o proteínas de la superficie celular, tales como nuevos antígenos.

Los métodos apropiados para analizar los miembros de la genoteca de expresión (parejas de unión candidatas) deberían ser bien conocidos por las personas expertas en la técnica. Generalmente, una primera etapa en un análisis posterior implicaría pruebas o ensayos para verificar que los miembros de la genoteca de expresión seleccionada (parejas de unión candidatas) realmente se han unido a las entidades dianas de interés. A este respecto puede usarse cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, en general, como se ha descrito antes, se podría usar a este respecto un ensayo ELISA policlonal. Como se ha analizado antes, esta etapa de verificación proporcionaría también una indicación puesto que cuando los miembros de la genoteca seleccionados estuvieran suficientemente enriquecidos en agentes de unión a la entidad diana de interés puede detenerse dicho cribado y puede ser comenzado el análisis más detallado de los clones seleccionados.

Por tanto, una vez que se ha completado la etapa de verificación, esto va seguido generalmente por un análisis de los clones individuales. Este análisis se puede llevar a cabo por métodos estándares. Por ejemplo para genotecas de expresión de fagos dicho análisis incluye clonar los polipéptidos presentados a los fagos en un formato soluble (por ejemplo, clonar scFv presentados a fagos en un formato scFv o Fab soluble) y usar los polipéptidos del formato soluble para realizar el ensayo ELISA o sobre células (Hoogenboom et al., 1999, *supra*) o antígenos purificados (usando fragmentos solubles), ensayos de cribado en filtros (Radosevic et al., *supra*), ensayos en clasificador de células activadas por fluorescencia (abreviadamente FACS por la expresión inglesa *Fluorescence-Activated Cell Sorter* (Ridgway et al., *supra*), ensayos Guava (Gillis y Fishwild, *Application note: Monoclonal Antibody Specificity using the Guava CellPaint Assay*, Guava Technologies, Inc., 2004) o ensayos de inmunofluorescencia (Wong et al., *supra*), tiñendo portaobjetos con tejidos o células y otros métodos de inmunohistoquímica. Todos estos métodos están bien establecidos en la bibliografía y para analizar los clones se pueden usar uno o más de ellos. Alternativamente, se pueden usar para caracterizar más los clones métodos de cribado directos, tales como los descritos en el documento WO03/095491, o un analizador FMAT (sistema de detección 8200 de Applied Biosystems). Finalmente, se puede usar un método denominado el método *AffiSelect* para analizar adicionalmente las parejas de unión candidatas. Los detalles de este método se describen más adelante en un apartado separado.

Por tanto, dicho análisis posterior de las parejas de unión candidatas, implica preferiblemente la expresión o producción de las parejas de unión candidatas, preferiblemente en una forma soluble, y analizar o ensayar la actividad de los candidatos para la entidad diana de interés. Se pueden usar cualesquiera ensayos de unión apropiados. Sin embargo, los ensayos preferidos son uno o más de ELISA, ensayos de cribado en filtros, FACS, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos inmunohistoquímicos, ensayos Guava, ensayos de detección celular 8200 o ensayos *AffiSelect* (véase más adelante).

Como control negativo, las parejas de unión candidatas se criban también convenientemente contra entidades no dianas, por ejemplo, tipos de células irrelevantes o tipos de células que no expresan la entidad diana en la superficie o expresan la entidad diana solamente a niveles bajos, o moléculas no revestidas irrelevantes o moléculas purificadas, según sea apropiado.

En todos estos métodos (excepto el método *AffiSelect*, que se describe con detalle más adelante) la detección de las parejas de unión candidatas unidas es facilitada por el uso de reactivos que reconocen alguna clase de etiqueta o marcador en el miembro de la genoteca de expresión. La genoteca de expresión es una genoteca de fagos, de modo que la detección puede ocurrir, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo para una proteína de la cubierta del fago, por ejemplo, un anticuerpo anti-Fd. Los sistemas de etiquetado y detección apropiados son muy conocidos y están descritos en la técnica.

En cualquier etapa la diversidad de las parejas de unión candidatas puede ser analizada por digestión con restricción del DNA codificante seguido por la secuenciación o análisis PAGE. Una vez más dichos métodos son muy conocidos y están descritos en la técnica (Hoogenboom et al., *supra*, Ridgway et al., *supra*).

En las realizaciones de la invención en donde la entidad diana es una molécula desconocida, por ejemplo, una molécula desconocida de la superficie celular, en particular una molécula desconocida de la superficie de un tumor, entonces la naturaleza de ésta también se puede analizar fácilmente y la entidad diana identificada usando una pareja de unión específica de la genoteca de expresión como herramienta. Esto es particularmente conveniente cuando la pareja de unión es una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula scFv. Por ejemplo, como se ha indicado antes, dichas parejas de unión de la genoteca de expresión son manipuladas generalmente por ingeniería genética para contener una etiqueta o marcador que pueda facilitar la detección y se pueden usar, por ejemplo, para analizar la distribución en tejidos de la molécula desconocida, por ejemplo, por unión a secciones de tejidos (Pereira et al., *J. Immunol. Métodos*, 1997, 203:11-24). Alternativamente, la pareja de unión puede ser inmovilizada sobre una fase sólida y ser usada para purificar la molécula desconocida, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. Una vez purificada entonces la identidad de la molécula desconocida podría ser determinada mediante ensayos apropiados dependientes de la naturaleza de la molécula. Por ejemplo, si la molécula desconocida es una proteína, la proteína purificada podría ser identificada luego y su secuencia de DNA codificante determinada por métodos de secuenciación de péptidos y clonación usando métodos muy conocidos y descritos en la técnica. Alternativamente, el DNA que codifica la proteína desconocida podría ser determinado fácilmente por cribado de una genoteca de cDNA con la pareja de unión identificada. A este respecto podrá ser usada una genoteca de cDNA altamente diversa a partir de una fuente apropiada. Sin embargo, preferiblemente podría usarse, una genoteca de cDNA restringida más pequeña. Por ejemplo, si la proteína desconocida se expresó sobre la superficie de un tipo de célula particular, entonces una genoteca de cDNA (por ejemplo, una genoteca de expresión en cDNA, tal como una genoteca de expresión en fagos) podría ser preparada convenientemente a partir de estas células y ser cribada con la pareja de unión (véase por ejemplo, Ridgway et al., *supra*), por ejemplo, sometiendo a rondas de cribados a la genoteca de visualización sobre soportes sólidos a los que está unido la pareja de unión identificada. Además, si la pareja de unión identificada de la genoteca de expresión es un anticuerpo entonces podrían llevarse a cabo otros ensayos basados en anticuerpos, tales como inmunoprecipitación, transferencia Western, perfilado de expresión o inmunohistoquímica para aislar o caracterizar la entidad diana.

Así pues, puede apreciarse que no solamente los métodos de la invención pueden ser usados para seleccionar e identificar parejas de unión para entidades dianas de genotecas de expresión apropiadas, sino que también pueden ser usados para identificar entidades dianas nuevas y desconocidas. Esto es importante puesto que puede conducir a la identificación de nuevas dianas celulares para la terapia o diagnóstico, así como a nuevos agentes con potencial para uso en terapia o diagnóstico, es decir, las parejas de unión.

Por tanto, la presente invención también proporciona un método para aislar y/o identificar una entidad diana desconocida que comprende las etapas (a) a (c) (y opcionalmente etapas adicionales) como se ha definido antes, (d) aislar uno o más miembros de la genoteca de expresión que se une(n) a dicha entidad diana desconocida y (e) usar dicho miembro de la genoteca para aislar y/o identificar la entidad diana a la cual se une en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos y en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que está unida a una fase sólida.

Los métodos de la invención pueden ser usados por tanto para seleccionar, identificar o aislar parejas de unión para una entidad diana, o una nueva entidad diana *per se*, que luego puede ser aislada, producida o manufacturada para diversos usos posteriores. Como tales, las parejas de unión/proteínas o entidades dianas identificadas o seleccionadas usando los métodos de la invención se describen en la presente memoria. Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método de seleccionar, identificar y/o aislar un miembro de una genoteca que es una pareja de unión específica para una entidad diana o un método de seleccionar, identificar y/o aislar una entidad diana *per se*, de una genoteca de expresión, comprendiendo dicho método las etapas de cribar una genoteca de expresión usando las etapas (a) a (c) (y opcionalmente etapas adicionales) como se han definido antes para seleccionar moléculas que presentan ciertas propiedades y opcionalmente (e) identificar y/o aislar miembro(s) relevante(s) de la genoteca que es(son) pareja(s) de unión específicas para la entidad diana y opcionalmente (f) usar dichos miembros de la genoteca para identificar la entidad diana a la que se unen, en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos y en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que está unida a una fase sólida.

Una vez que han sido identificados los fragmentos de ácidos nucleicos apropiados que codifican las parejas de unión o entidades dianas con propiedades particulares, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos pueden ser sometidos, si se desea, a una maduración por afinidad, por ejemplo, para tratar e identificar parejas de unión con propiedades más mejoradas. Dichas maduración por afinidad se puede realizar llevando a cabo cualquier forma convencional de mutagénesis, incluyendo, pero sin limitación, la adición, delección y/o sustitución de o uno o más nucleótidos de un modo controlado (por ejemplo, mutagénesis dirigida a un sitio) o un modo al azar, PCR de prueba y error, cambio de dominio, mutagénesis de casete y barajamiento de cadenas, etc., antes de la repetición del ciclo de cribados. Dicha maduración por afinidad puede realizarse, si se desea, después de las etapas de verificación descritas anteriormente y antes de que tenga lugar el análisis del clon individual.

Cuando se han seleccionado, identificado, aislado y/o purificado una o más parejas de unión o entidades dianas usando los métodos de la invención, estos candidatos, o uno de sus componentes, fragmentos, variantes, o derivados pueden ser manufacturados y si se desea formulados con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, estas moléculas pueden tomar la forma de ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas de proteínas, pudiendo a su vez dichos ácidos nucleicos ser incorporados en un vector de expresión apropiado y/o ser contenidos en una célula hospedante adecuada. Por tanto, en la presente memoria se describen moléculas de ácidos nucleicos que codifican dichas parejas de unión o entidades dianas o vectores de expresión que contienen dichas moléculas de ácidos nucleicos.

Una vez que se ha seleccionado, identificado etc., una pareja de unión o entidad diana o uno de sus componentes, fragmentos, variantes o derivados, de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión que codifica la pareja reunión o entidad diana seleccionada se puede usar fácilmente (o ser adaptado para uso) para producir cantidades suficientes de la molécula por expresión en células o sistemas hospedantes adecuados y aislar las moléculas de unión de la célula o sistema hospedante o del medio de crecimiento o de su líquido sobrenadante, según sea apropiado. Alternativamente, dichas moléculas de unión o entidades dianas pueden ser producidas por otros métodos apropiados, por ejemplo, por síntesis química del ácido nucleico que codifica la molécula de unión y expresión en un hospedante adecuado o en un sistema de transcripción *in vitro*.

Las variantes o derivados de una pareja de unión o entidad diana incluyen equivalentes peptoides, moléculas con una cadena principal sintética no peptídica y polipéptidos relacionados con, o derivados de, el polipéptido identificado original en donde la secuencia de aminoácidos ha sido modificada por sustituciones, adiciones y/o delecciones de aminoácidos sencillas o múltiples que pueden incluir alternativamente o adicionalmente la sustitución con, o la adición de, aminoácidos que han sido modificados químicamente, por ejemplo, por desglucosilación o glicosilación. Convenientemente, dichos derivados o variantes pueden tener una identidad de secuencia de al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99% con respecto al polipéptido original del cual proceden.

Las variantes o derivados de una molécula de anticuerpo incluyen además la conversión de un formato de la molécula de anticuerpo en otro forma formato (por ejemplo, la conversión de Fab en scFv o viceversa, o la conversión entre cualquier formato de moléculas de anticuerpos descrito en cualquier parte de la presente memoria), o la conversión de una molécula de anticuerpo en una clase particular de molécula de anticuerpo (por ejemplo, la conversión de un molécula de anticuerpo en una IgG o una de sus sub-clases, por ejemplo, IgG1 o IgG3, que son particularmente adecuadas para anticuerpos terapéuticos).

Las variantes o derivados incluyen además la asociación de moléculas parejas de unión o entidades dianas con más componentes funcionales que, por ejemplo, pueden ser útiles en aplicaciones posteriores de dichas parejas de unión o entidades diana. Por ejemplo, las parejas de unión o entidades diana pueden ser asociadas con componentes que los dirigen a una diana constituida por un sitio particular del cuerpo, o restos detectables útiles, por ejemplo, en obtención de imágenes u otras aplicaciones de diagnóstico.

Claramente, el principal requisito para dichos componentes, fragmentos, variantes, o moléculas de parejas de unión derivadas es que retengan su actividad funcional original en términos de capacidad de unión o tengan una actividad funcional mejorada.

5 Las moléculas de parejas de unión (preferiblemente moléculas de anticuerpos) o entidades dianas aisladas, detectadas, seleccionadas o identificadas que usan los métodos de la presente invención se pueden usar en cualesquiera métodos en donde se requieren parejas de unión específicas para una entidad diana (por ejemplo, anticuerpos específicos para un antígeno particular). Por tanto, las parejas de unión (preferiblemente moléculas de anticuerpos) o las entidades dianas se pueden usar como herramientas moleculares. También se describe un reactivo que comprende dichas moléculas de parejas de unión o moléculas de entidades dianas como se han definido en la presente memoria. Además, dichas moléculas se pueden usar para aplicaciones terapéuticas o profilácticas *in vivo* o aplicaciones de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*, o en ensayos *in vitro*.

15 Las parejas de unión se pueden usar en aplicaciones terapéuticas, bien sea en una forma aislada de las genotecas de expresión o manipuladas por ingeniería genética o en formas convertidas, por ejemplo, puede ser deseable convertir una molécula de scFv en una IgG o en péptidos multimerizados. El efecto terapéutico podría ser efectuado induciendo una actividad biológica en la molécula terapéutica que muestra una unión agonista o antagonista para la entidad diana/ligando, por ejemplo, induciendo la apoptosis (por ejemplo, de células cancerosas o infectadas por virus), inhibiendo el crecimiento o estimulando el desprendimiento de la matriz por bloqueo del ligando natural de unión (para inhibir de este modo el crecimiento y/o la diseminación de los tumores). Dichos efectos terapéuticos se podrían conseguir debido a las propiedades de la entidad diana/ligando propiamente dicho, o uno de sus multímeros (algunos receptores son activados mediante su reticulación).

20 Cuando las parejas de unión seleccionadas o identificadas etc., son anticuerpos polipeptídicos, entonces estos se pueden usar para aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, por ejemplo, para conferir inmunidad pasiva a individuos particularmente susceptibles (por ejemplo, pacientes inmunocomprometidos, niños pequeños, fetos de mujeres embarazadas, gentes residentes en zonas de enfermedades endémicas, etc.). Por ejemplo, si los anticuerpos son capaces de neutralizar los agentes infecciosos o relacionados con la enfermedad entonces estos se pueden administrar a un sujeto apropiado para combatir la enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos (u otras formas de parejas de unión) pueden ser unidos a otras moléculas terapéuticamente eficaces, por ejemplo, a agentes citotóxicos (molécula pequeña o proteína), pretoxina u otros fármacos y dianizados (es decir, dirigidos) al tejido de la enfermedad o a tipos específicos de células, por ejemplo, células tumorales o células infectadas con virus. Además, los efectos terapéuticos podrían ser conseguidos por otras funciones manipuladas por ingeniería genética en el agente que se ha de administrar como la capacidad para activar los macrófagos, el complemento o las células T citotóxicas, siendo dichas funciones conferidas después de cambiar scFv a una Ig, generación de moléculas biespecíficas, por ejemplo, unir células tumorales y células asesinas.

25 Alternativamente dichos anticuerpos (o realmente otros tipos de polipéptidos que interactúan con entidades dianas asociadas con un tejido o sitios del cuerpo particulares, o tipos de células, por ejemplo, células tumorales o células infectadas con virus) pueden ser conjugados a etiquetas, por ejemplo, colorantes, marcadores fluorescentes o radiactivos o etiquetas detectables enzimáticamente, y usarse para la diagnosis *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, por métodos de obtención de imágenes o métodos inmunohistoquímicos estándares. Otros usos preferidos incluyen usos que son simultáneamente de diagnóstico y terapéuticos (denominados en inglés *theranostics*) (es decir, los anticuerpos o parejas de unión usados tanto en diagnosis como en terapia). Además, dichas moléculas de anticuerpos u otras parejas de unión se pueden usar en métodos de cromatografía de afinidad para aislar las entidades dianas.

30 En particular, los anticuerpos para proteínas expresadas en la superficie celular proporcionan un punto de partida bien descrito para el desarrollo satisfactorio de nuevos fármacos de diagnóstico y terapéuticos. Esto es particularmente el caso en el campo del cáncer, en donde el conocimiento, de marcadores de la superficie celular específicos, así como los anticuerpos que se unen a ellos, es un cuello de botella claro en el desarrollo de fármacos, y los métodos de la invención se pueden usar para identificar o seleccionar tanto nuevos marcadores de la superficie celular (entidades dianas) como anticuerpos (parejas de unión). Actualmente solamente, son conocidos un número muy limitado de epítomos asociados a tumores expresados en la superficie celular o específicos de tumores. Por tanto, cada nuevo epítomo de dicho tipo - y naturalmente los anticuerpos específicos que se unen a ellos abrirían nuevas posibilidades en el tratamiento del cáncer. Las posibles aplicaciones abarcan desde productos anticuerpos IgG completos no revestidos para una terapia basada en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (abreviadamente ADCC por expresión inglesa *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*), sobre construcciones recombinantes oligo-específicas/oligo-valentes, a inmunotoxinas de proteína de fusión y fragmentos de anticuerpos radio-marcados para terapia específica de tejidos y dirigida (dianizada) a tejidos, así como anticuerpos acoplados a colorantes o agentes radiactivos para la diagnosis *in vitro* o *in vivo*.

35 Las entidades dianas o sus fragmentos podrían ser usadas como vacunas, en particular vacunas para uso en el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas (dependiendo naturalmente de la entidad diana en cuestión). La entidad diana puede ser usada como diana para agonistas y antagonistas, en forma de péptidos, proteínas o fármacos de pequeño tamaño molecular, que, por ejemplo, pueden bloquear o inducir funciones como la apoptosis o regular el crecimiento celular. Las entidades dianas también se pueden usar como dianas para más cribados, para identificar incluso más moléculas capaces de desempeñar algunas de las funciones descritas anteriormente. En algunos casos, las entidades dianas o sus fragmentos podrían tener también un efecto por sí mismas, como la unión competitiva de moléculas que se unen a ellas naturalmente.

Las adaptaciones adecuadas y apropiadas de las moléculas de anticuerpos, si fuera necesario, para dichos usos, por ejemplo, la conversión a las clases IgG1 o IgG3 para terapia, la incorporación o adición de una etiqueta apropiada para formación de imágenes, etc., serían bien conocidas por las personas expertas en la técnica.

5 Los anticuerpos más adecuados para los diversos usos descritos anteriormente se pueden identificar fácilmente usando ensayos apropiados que pueden ser diseñados por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, en aplicaciones en donde es importante la alta afinidad o avidéz de un anticuerpo o una pareja de unión estos criterios pueden ser fácilmente probados en anticuerpos candidatos usando técnicas de ensayo estándares (por ejemplo, ensayos *Biacore*). Además, cuando se han identificado anticuerpos contra un agente infeccioso particular, por ejemplo, una bacteria, virus etc., se pueden llevar a cabo, ensayos apropiados para determinar que anticuerpos son los más eficaces para neutralizar el agente infeccioso. Por ejemplo, en el caso de bacterias, se puede determinar la actividad bactericida y opsonofagocítica contra las bacterias in cuestión. Similarmente, en el caso de virus, se pueden realizar estudios de neutralización viral para identificar los mejores candidatos.

15 Una realización preferida de los métodos de la invención descrita en la presente memoria se refiere al uso de una genoteca de expresión para expresión de anticuerpos de fagos descrito en la presente memoria para aislar, detectar, identificar o seleccionar una o más moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a uno o más antígenos dianas, por ejemplo, uno o más antígenos dianas que están asociados con células, tejidos o agentes extraños de enfermedades particulares. Por ejemplo, por esto se podría llevar a cabo cribando las genotecas de expresión con los antígenos dianas.

20 También se describen moléculas de anticuerpos como tales aisladas, detectadas, identificadas, seleccionadas o manufacturadas (u otras parejas de unión), o entidades dianas, para uso en terapia o diagnóstico *in vivo* o para uso en cualquiera de las otras aplicaciones antes mencionadas. También se describe el uso de dichas moléculas de anticuerpos (u otras parejas de unión), o entidades dianas, en la fabricación de un medicamento o composición para uso en terapia (en particular terapia para cáncer o enfermedades infecciosas) o diagnóstico *in vivo* o para uso en cualquiera de las otras aplicaciones antes mencionadas. También se describen métodos de tratamiento de un paciente que comprenden la administración de una dosis apropiada de dicha molécula de anticuerpo (u otras parejas de unión), o entidad diana.

25 Cuando se usan dichas moléculas de anticuerpos (u otras parejas de unión) o entidades dianas se emplean en los usos y métodos antes descritos entonces dichas moléculas pueden ser administradas de cualquier modo apropiado. Por ejemplo, dichas moléculas de anticuerpos (u otras parejas de unión) o entidades dianas, pueden ser administradas localmente en el sitio en donde se requiere la acción o pueden ser unidas o asociadas de otro modo con las entidades que facilitarán el envío a la diana de las moléculas de anticuerpos (u otras parejas de unión), o entidades dianas, en una localización apropiada del cuerpo.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de anticuerpos (u otras parejas de unión), o entidades dianas, como se han definido en la presente memoria, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 También se describen métodos de diagnóstico o de obtención de imágenes de un paciente que comprende la administración de una cantidad apropiada de una molécula de anticuerpo (u otra pareja de unión), o entidad diana, como se han definido en la presente memoria, a un paciente y detectar la presencia, localización y/o la cantidad de la molécula de anticuerpo en el paciente.

40 Las moléculas de anticuerpos (u otras parejas de unión) o entidades dianas, identificadas, seleccionadas etc., de las genotecas de expresión de la invención se pueden usar igualmente en métodos de diagnóstico que se llevan a cabo *in vitro*, si es apropiado, por ejemplo, en una muestra de tejido o alguna otra clase de muestra, por ejemplo, sangre, obtenida o procedente de un paciente.

Las enfermedades preferidas que han de ser tratadas o diagnosticadas, etc., son cáncer, enfermedades infecciosas causadas por agentes infecciosos, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes o enfermedades degenerativas.

45 Los términos "terapia" o "tratamiento" como se usan en la presente memoria incluyen terapia profiláctica. Los términos "terapia" y "tratamiento" incluyen combatir o curar enfermedades infecciosas, pero también incluyen controlar o aliviar la enfermedad o infección o los síntomas asociados a las mismas.

#### Método AffiSelect

50 \*El método *AffiSelect* proporciona una nueva técnica para identificar indirectamente el miembro de la genoteca (pareja de unión candidata) mediante la detección de su ligando (o al menos detectando una entidad con la cual está asociado el ligando) en contraposición a detectar el miembro de la genoteca (pareja de unión candidata). Esto es de un valor particular en el cribado de pequeñas genotecas contra ligandos complejos como células vivas, aunque la aplicabilidad del método no está limitada a estas aplicaciones.

55 Por tanto, en su significado más general el método *AffiSelect* proporciona un método de cribar una genoteca de moléculas (en este caso las parejas de unión candidatas que han de ser sometidas a un análisis posterior) para identificar

y/o seleccionar uno o más de sus miembros que son parejas de unión candidatas para uno o más ligandos (entidades dianas) que comprende:

a) poner en contacto una genoteca de expresión de parejas de unión candidata en solución con uno o más ligandos;

5 b) capturar ligandos que han llegado a estar unidos a uno o más miembros de la genoteca de expresión sobre una fase sólida; y

c) detectar la presencia de un ligando, detectando con ello la presencia de uno o más miembros de la genoteca de expresión que son parejas de unión candidatas para el ligando.

10 Por tanto, cuando se usa en combinación con los métodos de cribado de la presente invención, con el fin de analizar posteriormente las parejas de unión candidatas que han sido identificadas, el método *AffiSelect* comprende las etapas de:

i) poner en contacto una o más de dichas parejas de unión candidatas en solución con una o más entidades dianas;

15 ii) capturar las entidades dianas que han llegado a quedar unidas a una o más de las parejas de unión candidatas sobre una fase sólida; y

iii) detectar la presencia de una entidad diana, detectando con ello la presencia de una o más de las parejas de unión candidatas para la entidad.

20 Por tanto, empleando la terminología usada en la descripción de los métodos de cribado de la presente invención, en la definición del método *AffiSelect* que se facilita a continuación, cualquier referencia a una genoteca de expresión debe ser entendida en el sentido de que se refiere a una o más de las parejas de unión candidatas que han de ser sometidas a un análisis posterior y cualquier referencia a ligandos debe ser entendida en el sentido de que se refiere a las entidades dianas.

25 Uno de los principales requisitos para las genotecas de expresión (en este caso las parejas de unión candidatas que han de ser sometidas a un análisis posterior) para ser usadas en el método *AffiSelect* es que deben estar en solución cuando se ponen en contacto inicialmente con los ligandos (entidades dianas) contra los cuales están siendo cribadas. Por "en solución" se quiere significar que las genotecas de expresión no están unidas a una fase sólida cuando se ponen en contacto inicialmente con los ligandos contra los cuales están siendo cribadas, es decir, las genotecas de expresión iniciales son genotecas de expresión no inmovilizadas.

30 Las construcciones de genotecas de expresión (parejas de unión candidatas) para uso en el método *AffiSelect* (y por tanto también para las construcciones de parejas de unión candidatas que completan la genoteca de expresión cribada en la etapa (a) de los métodos de la presente invención) pueden contener opcionalmente y adicionalmente otros componentes apropiados, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores inducibles o no inducibles para iniciar la transcripción, potenciadores, genes de resistencia a antibióticos, y marcadores, etiquetas generales o moléculas indicadoras, sitios de unión a cebadores para facilitar la amplificación de las construcciones, por ejemplo, PCR u otros elementos de secuencias deseables. Las fuentes apropiadas y el posicionamiento de dichos componentes adicionales dentro de las construcciones de la genoteca de modo que realicen su función deseada estarían bien dentro de la práctica normal de una persona experta en la técnica.

35 La inclusión de etiquetas o marcadores generales en las construcciones de la genoteca y en los miembros de genotecas expresados (parejas de unión candidatas) es particularmente importante en las genotecas de expresión que se utilizan en el método *AffiSelect*, utilizándose dichas etiquetas para facilitar la unión de los miembros de la genoteca (parejas de unión candidatas) a una fase sólida en la etapa de captura del método, es decir se usan para facilitar la etapa de captura. En este aspecto puede usarse cualquier etiqueta apropiada siempre que pueda facilitar la unión de los miembros de la genoteca (parejas de unión candidatas) a una fase sólida. Sin embargo, convenientemente dichas etiquetas son moléculas de afinidad que pueden facilitar la unión a una fase sólida uniéndose a una molécula de afinidad pareja inmovilizada directa o indirectamente en la fase sólida. Etiquetas ilustrativas pueden ser las etiquetas c-myc (que pueden ser capturadas, por ejemplo, por medio de un anticuerpo anti-c-myc) o etiquetas His (que pueden ser capturadas, por ejemplo, por medio de una superficie de níquel) o biotina (que puede ser capturada, por ejemplo, por medio de moléculas de estreptavidina) o una proteína superficial de fago, tal como gp8, (que puede ser capturada, por ejemplo, por medio de un anticuerpo anti-gp8) o etiquetas de péptidos antígenos, tales como FLAG o HA, que pueden ser reconocidos por un anticuerpo. Dichas etiquetas o marcadores pueden también ser convenientemente detectables de modo directo o indirecto. Dichas etiquetas o marcadores son típicamente etiquetas o marcadores generales que están presentes en todas las construcciones de genotecas y pueden utilizarse para capturar los miembros de la genoteca sobre una fase sólida. Dichas etiquetas o marcadores no se requieren para la etapa de detección de los métodos *AffiSelect* (puesto que la detección se realiza por medio de la detección del ligando en lugar de la detección del miembro de la genoteca, véase con más detalle a continuación). Sin embargo, si se desea dichas etiquetas pueden utilizarse para detectar la presencia de miembros de la genoteca. Su presencia puede demostrarse extremadamente útil en la determinación de la afinidad de un ligando por un miembro de la genoteca.

Una vez que han sido obtenidas las construcciones de las genotecas de expresión (pareja de unión candidata) al nivel de ácidos nucleicos, dichas construcciones pueden ser expresadas para cribado y para uso en la etapa (i) del método en sistemas de expresión apropiados. Las condiciones y métodos apropiados de expresión son muy conocidos y están descritos en la técnica.

5 Las entidades dianas para uso en el método *AffiSelect* pueden tomar cualquiera de las formas antes descritas. Así, por ejemplo, las entidades dianas pueden ser moléculas de la superficie celular proporcionadas, por ejemplo, como un componente de células enteras o como fracciones de membranas celulares o pueden ser una entidad diana de interés unida a una fase sólida apropiada. Preferiblemente, dichas entidades dianas son moléculas de la superficie celular. Conve-  
10 nientemente, puesto que el método *AffiSelect* se utiliza para análisis posterior de las parejas de unión candidatas iniciales identificadas por los métodos de cribado en la separación de la fase orgánica aquí descritos, las entidades dianas pueden ser las mismas que las utilizadas en la etapa (a) de estos métodos.

15 Si el ligando (entidad diana) es una molécula de la superficie celular o una molécula de interés unida a una fase sólida apropiada, para utilizar en el método *AffiSelect*, los ligandos contienen o están asociados a un resto indicador para permitir la detección de los ligandos. Dichos restos indicadores son preferiblemente moléculas de ácidos nucleicos, más preferiblemente moléculas de DNA, que pueden ser detectadas a continuación por métodos basados en ácidos nucleicos. Un método de detección preferido es por PCR, pero puede aplicarse cualquier método apropiado, por ejemplo hibridación de una sonda marcada. Alternativamente, el ligando puede unirse a una perla fluorescente no magnética o a otra población de perlas de tamaño distinguible que puede ser contada/detectada en el microscopio o por un aparato *Coulter Counter ZM* (Coulter Electronics Ltd.). Por tanto, puede observarse que dichos restos indicadores pueden tomar una amplia variedad de  
20 formas diferentes que hacen que sea posible la detección de dichos restos indicadores.

Dichos restos indicadores pueden estar asociados inherentemente a los ligandos (entidades dianas). Por ejemplo, si el ligando (entidad diana) es un molécula de la superficie celular, entonces un resto indicador preferido para ser detectado sería una molécula de DNA, por ejemplo un gen (es decir un gen indicador) que esté presente en las células en las que el ligando se expresa/visualiza. Los restos indicadores apropiados y preferidos son por consiguiente restos que están  
25 presentes en todo tipo de células, por ejemplo, un gen de viabilidad de la célula, tal como  $\beta$ -actina.

Alternativamente, un resto indicador exógeno puede asociarse al ligando (entidad diana). Por ejemplo, en el caso de células, puede introducirse en las células un resto indicador exógeno (por ejemplo, un gen indicador) por métodos estándares, por ejemplo, transfección, incluyendo, aunque sin limitación, lipofección, sistemas retrovirales o electroporación.

30 Si el ligando (entidad diana) es una molécula no revestida, por ejemplo un polipéptido no revestido, puede entonces ser marcado o asociado con un resto indicador apropiado utilizando métodos bien conocidos y descritos en la técnica, por ejemplo, si el ligando está asociado a su ácido nucleico codificante u otra etiqueta basada en ácidos nucleicos, por ejemplo como se ha descrito antes, el resto indicador puede estar dispuesto dentro de esta molécula de ácidos nucleicos. Si el ligando es una molécula, por ejemplo un polipéptido, unido a una fase sólida particular, entonces dicho resto indicador  
35 podría unirse a la fase sólida separadamente del polipéptido, por ejemplo utilizando métodos similares a los descritos anteriormente. En particular, si se usan perlas de estreptavidina entonces el resto indicador es preferiblemente un fragmento de DNA biotinilado que comprende un sitio o región que pueda facilitar la detección del resto indicador, por ejemplo un sitio cebador que permita la amplificación por PCR de un fragmento del gen indicador o un sitio de unión a la sonda. Cada perla puede llevar entonces una mezcla de resto indicador biotinilado y polipéptido biotinilado (u otro ligando).

40 Por consiguiente, puede observarse que dicha "asociación" entre un resto indicador y el ligando (entidad diana) puede comprender una interacción directa entre el resto indicador y el ligando, es decir, el resto indicador y el ligando son parte de la misma molécula, por ejemplo la proteína del ligando y el resto indicador están conjugados entre sí como parte de la entidad molecular. Alternativamente, dicha "asociación" puede ser indirecta, por ejemplo el resto indicador está unido o contenido dentro de un resto al que está unido el ligando, por ejemplo, está contenido dentro de la célula en la que se  
45 expresa o visualiza o inmoviliza el ligando en la fase sólida a la que está unido el ligando.

Dichos restos indicadores son preferiblemente restos indicadores generales que se asocian con todos los ligandos (entidades dianas) que se visualizan y por consiguiente pueden ser utilizados como un reactivo general para detectar la presencia de cualquiera y de todos los ligandos dianas (y con ello la presencia de una pareja de unión candidata).

50 La etapa de puesta en contacto de los ligandos (entidades dianas) con la genoteca de expresión (parejas de unión candidatas) o viceversa en el método *AffiSelect* puede realizarse de cualquier modo apropiado en condiciones tales que las parejas de unión candidatas apropiadas puedan interactuar con los ligandos (entidades diana) que están presentes o unirse a ellos. Dichas condiciones variarán generalmente dependiendo de la naturaleza de la genoteca de expresión (parejas de unión candidatas), del ligando (entidades diana) y del resto con el que está asociado el ligando (entidades dianas). Sin embargo, las condiciones apropiadas para facilitar la unión pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Dicha etapa de "puesta en contacto" tendrá lugar generalmente en una solución apropiada o en un medio acuoso. Así, si el ligando está presente en una célula que está cultivada en forma de una monocapa o en células que se obtienen de un mamífero, por ejemplo, de un órgano o tejido de mamífero, entonces generalmente estas se recogen y se vuelven a poner en suspensión en un medio acuoso por técnicas apropiadas antes de ser puestas en contacto con la genoteca de  
55 expresión.

Es importante saber que se ha encontrado que en el método *AffiSelect* la etapa de puesta en contacto puede realizarse en un medio de expresión bacteriano, por ejemplo caldo de Luria, así como en medios acuosos típicos, tal como PBS. Esto es importante y sorprendente debido a que significa que los miembros de la genoteca (parejas de unión candidatas) pueden expresarse en bacterias (por ejemplo, cultivándolos en un medio de expresión bacteriano, tal como caldo de Luria) y los clones pueden tomarse directamente de la placa de expresión para utilizar en los métodos de cribado *AffiSelect*. Preferiblemente, dicho medio de expresión bacteriano se hace isotónico (por ejemplo, hasta aproximadamente NaCl 140 mM, (el caldo de Luria es generalmente NaCl 171 mM)) antes de que sean añadidos los ligandos (entidades dianas) pero después que haya sido inducida la expresión de los miembros de la genoteca. Esta etapa de hacer isotónico el medio bacteriano es especialmente preferida cuando los ligandos (entidades dianas) son moléculas de la superficie celular sobre células de vivas en lugar de sobre perlas.

Las condiciones de "puesta en contacto" ilustrativas pueden comprender la incubación sobre hielo o a 4°C entre 30 minutos y 4 horas. Sin embargo, estas pueden ser variadas según convenga dependiendo de la naturaleza de los ligandos, las genotecas de expresión, etc. La mezcla genoteca de expresión-ligando puede ser sometida opcional y preferiblemente a balanceo, mezclamiento o rotación suave. Además, pueden añadirse otros reactivos apropiados, tales como agentes de bloqueo, para reducir la unión no específica. Por ejemplo, puede utilizarse BSA al 1-4% u otro agente de bloqueo adecuado (por ejemplo, leche). Sin embargo, se apreciará que las condiciones de puesta en contacto pueden ser variadas y adaptadas por un experto en la técnica dependiendo del objetivo del método de cribado. Por ejemplo, si se aumenta la temperatura de incubación, por ejemplo hasta la temperatura ambiente, puede aumentar la posibilidad de identificar uniones a un subconjunto diferente de ligandos, por ejemplo uniones a proteínas de la superficie celular que están fácilmente internalizadas. De nuevo dichas adaptaciones a las condiciones están al alcance de los expertos en la técnica.

Convenientemente, se puede variar el número de copias de ligandos (entidades dianas) alterando el número de restos presentes con los que se asocian los ligandos. Por ejemplo, cuando el ligando es una molécula de la superficie celular o una molécula unida a un soporte sólido, entonces puede ajustarse el número de ligandos dianas aumentando o disminuyendo el número de células o soportes sólidos presentes en la mezcla de puesta en contacto. El número de ligandos requeridos puede determinarse fácilmente por el método de prueba y error, aunque, por ejemplo, cuando el ligando es una molécula de la superficie celular se utilizan convenientemente 5.000 a 200.000 células. Realmente es una ventaja del método *AffiSelect* que sea suficientemente sensible para trabajar con un número de células tan bajo como 5.000 o 1.000 células (o incluso menos, por ejemplo, el uso de PCR como método de detección debe permitir potencialmente la detección de una sola célula). A este respecto, particularmente en el caso de cribado con células vivas procedentes de mamíferos, por ejemplo pacientes humanos, dichas células son con frecuencia fuentes raras y pueden no estar disponibles en gran número. Por tanto, poder realizar el cribado de dicho bajo número de células es una ventaja importante. Se ha demostrado que cuando la detección se realiza por PCR y las parejas de unión candidatas son anticuerpos, sólo se requieren 40 pg de anticuerpo para hacer posible la detección. Esto significa que el método *AffiSelect* debe ser adaptado para analizar parejas de unión candidatas para moléculas de ligando que se expresan a un nivel muy bajo, por ejemplo, cuando se expresan menos de 1000 moléculas.

Para la etapa de puesta en contacto (i) del método *AffiSelect* (y por consiguiente en las etapas siguientes del método) pueden estar presentes uno o más tipos de parejas de unión candidatas (es decir, una o múltiples parejas de unión candidatas) en el mismo recipiente de reacción o compartimento de ensayo (por ejemplo, pocillo de ensayo). Sin embargo, preferiblemente sólo un tipo de pareja de unión candidata está presente en el recipiente de reacción o compartimento de ensayo para la etapa de puesta en contacto (i).

Una vez que los ligandos (entidades dianas) han sido puestos en contacto con la genoteca de expresión (parejas de unión candidatas) en condiciones tales que los ligandos puedan llegar a unirse a uno o más miembros de la genoteca de expresión, los ligandos que se han unido de este modo son entonces capturados sobre una fase sólida para facilitar su aislamiento o separación o purificación de los otros componentes de la mezcla de reacción, tales como los ligandos no unidos. En otras palabras, durante la etapa de captura sólo los ligandos (entidades dianas) que se unen a un miembro de la genoteca de expresión (pareja de unión candidata) son capturados en la fase sólida.

A este respecto las fases sólidas preferidas son fases sólidas en forma de partículas que facilitan la manipulación y el lavado. Son especialmente preferidas las fases sólidas magnéticas y especialmente las partículas/perlas magnéticas. Con el fin de distinguir estas fases sólidas de las fases sólidas a las que pueden unirse los ligandos (entidades dianas) (como se ha descrito antes), dichas fases sólidas pueden denominarse "fases sólidas de captura". Las perlas magnéticas adecuadas las comercializadas por Dyno Specialty Polymers AS de Lillestrøm, Noruega and Dynal Biotech ASA. Ejemplos particulares de perlas magnéticas que pueden ser utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son las perlas M-450, M-270 o M-280 de Dynal Biotech ASA, Noruega.

Los complejos ligando (entidad diana)-miembro de la genoteca (pareja de unión candidata) pueden ser capturados en una fase sólida por cualquier método apropiado. Un método preferido de acuerdo con el método *AffiSelect* implica la interacción de una molécula de captura en la fase sólida con una molécula pareja o etiqueta asociada a los miembros de la genoteca de expresión (parejas de unión candidatas), es decir, la etapa de captura es facilitada por una molécula o etiqueta en la pareja de unión candidata. De este modo sólo los ligandos que se unen a miembros de la genoteca de expresión son capturados en la fase sólida. Todos los ligandos que no se unen a los miembros de la genoteca de expresión pueden, si se desea, ser eliminados por una o más etapas de lavado de la fase sólida, o sencillamente separando la fase sólida de la mezcla de reacción después de que haya tenido lugar la captura. Así, puede observarse que cuando la etapa de captu-



ra es facilitada por los miembros de la genoteca de expresión en lugar de por los ligandos, el aislamiento de la fase sólida del resto de la mezcla permitirá la separación de los ligandos que no se han unido a los miembros de la genoteca.

La interacción entre una molécula de captura en la fase sólida y la molécula pareja o etiqueta en el miembro de la genoteca de expresión se basa convenientemente en la interacción por afinidad, aunque puede usarse cualquier otra reacción apropiada. Por ejemplo, los miembros de la genoteca de expresión pueden manipularse genéticamente para que expresen un componente de la interacción por afinidad y el otro componente puede unirse a la fase sólida por cualquier medio apropiado. Ejemplos preferidos de dichas interacciones por afinidad son interacciones anticuerpo-antígeno e interacciones estreptavidina-biotina.

Las perlas revestidas con estreptavidina están comercializadas y pueden utilizarse para capturar conjugados ligando-miembro de la genoteca mediante la presencia de una molécula de biotina en la parte del miembro de la genoteca del conjugado. Alternativamente, si la genoteca de expresión es una genoteca de fagos entonces puede realizarse fácilmente la captura utilizando una fase sólida a la que se ha unido un anticuerpo para una proteína de la superficie de fagos, por ejemplo anti-gp8. Alternativamente, los miembros de la genoteca pueden manipularse por ingeniería genética para que expresen una etiqueta que es reconocida por una pareja de afinidad que facilita la unión a la fase sólida. Ejemplos de etiquetas apropiadas son c-myc (u otras etiquetas peptídicas antigénicas) o etiquetas His que pueden ser reconocidas por anticuerpos anti-c-myc (u otros anticuerpos apropiados) e iones metálicos (por ejemplo, Ni<sup>2+</sup>), respectivamente, que puede facilitar a su vez la captura a la fase sólida. Cuando se utilizan anticuerpos para facilitar la captura, dichos anticuerpos pueden unirse a la fase sólida directa o indirectamente, por ejemplo, por medio de un anticuerpo secundario o terciario apropiado, tal como un anticuerpo anti-IgG. La captura puede efectuarse de cualquier modo apropiado dependiendo de los reactivos utilizados. Así, los anticuerpos pueden unirse a la fase sólida, que se pone entonces en contacto con la mezcla que contiene los complejos ligando (entidad diana)-miembro de la genoteca (pareja de unión candidata). Alternativamente, puede dejarse que los anticuerpos se unan a los miembros de la genoteca en la mezcla de reacción antes de que los anticuerpos se unan a la fase sólida (por ejemplo, por medio de un anticuerpo secundario) para facilitar la captura del ligando-miembro de la genoteca. Realmente esta es una realización preferida de los métodos *AffiSelect*. Las condiciones de captura apropiadas en términos de temperatura y tiempo pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Sin embargo, las condiciones ilustrativas pueden comprender incubación durante 10 minutos a 2 horas a la temperatura ambiente o a 4°C (dependiendo de la estabilidad del ligando o del miembro de la genoteca), preferiblemente con balanceo, mezclamiento o rotación suaves. La cantidad de fase sólida que se debe incluir o la relación de fase sólida a ligando que se debe incluir para facilitar la captura de los complejos ligando-miembro de la genoteca puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica.

En el método *AffiSelect* pueden realizarse en cualquier etapa apropiada una o más etapas de lavado. Por ejemplo, como se ha descrito antes, se realiza una etapa de lavado (o al menos una etapa de separación) después de la etapa (ii) con el fin de separar los ligandos (entidades dianas) que no se han unido a los miembros de la genoteca de expresión (parejas de unión candidatas). Después de la etapa (i) podría realizarse también una o más etapas de lavado de los restos con los que se asocian los ligandos (por ejemplo, el lavado de las células o las fases sólidas con las que se asocian los ligandos), con el fin de separar los miembros de la genoteca de expresión que no se han unido al ligando. Realmente, se prefieren dichas etapas de lavado. También, puede realizarse una o más etapas de lavado de los restos con los que se asocian los ligandos, o de las fases sólidas, en otros momentos apropiados durante la realización del método, por ejemplo, para separar las entidades no unidas. Cuántas etapas de lavado se deben incluir puede ser determinado por un experto en la técnica.

La etapa de detectar la presencia de un ligando (entidad diana) se realiza detectando el ligando directamente o al menos detectando una entidad (no el miembro de la genoteca) con el que se asocia el ligando. Esta etapa proporciona un contraste con los métodos de la técnica anterior en los que la detección se realizaba generalmente por la detección del miembro de la genoteca que está unido al ligando en lugar de la detección del ligando.

La detección de la presencia de un ligando/entidad diana (y por consiguiente la presencia de un complejo ligando-miembro de la genoteca, puesto que los ligandos que no habrán formado complejos han sido separados por la etapa de captura ya que no han llegado a unirse a la fase sólida) se realiza convenientemente detectando la presencia de un resto indicador en el ligando o asociado a él. Los restos indicadores apropiados se han indicado anteriormente. Como se ha descrito anteriormente, dichos restos indicadores están generalmente presentes en todos los ligandos o asociados a ellos, es decir, son etiquetas generales para todos los ligandos. Por tanto, puesto que el mismo resto indicador está presente en cada ligando (o asociado con él), la presencia de una señal positiva indica la presencia de un conjugado ligando-miembro de la genoteca y por consiguiente de un miembro de la genoteca que es una pareja de unión candidata para un ligando. Debe observarse, sin embargo, que si el resto indicador está presente en una célula, es decir, en realizaciones en las que el ligando es una molécula de la superficie celular, entonces tendrá que ser expuesto, por ejemplo, por lisis celular u otros medios de rotura celular, antes de que tenga lugar la detección. Así, en estas realizaciones de la invención, en las que se utilizan los métodos *AffiSelect* para análisis adicional de las parejas de unión candidatas, la presencia de una señal positiva proporciona una indicación más de la presencia de una pareja de unión candidata que potencialmente se une a la entidad diana correspondiente. Si en la reacción de detección está presente más de una pareja de unión candidata, entonces puede realizarse el análisis adicional para determinar cuál de las parejas de unión candidatas se une a la entidad diana. Preferiblemente, sin embargo, como se ha indicado anteriormente, sólo un tipo de pareja de unión candidata estará presente en la reacción de detección y por tanto la presencia de una señal positiva indicará la presencia de una pareja de unión candidata que se une potencialmente a la entidad diana correspondiente.

Los métodos apropiados de lisis/rotura de las células para exponer los restos indicadores que están presentes, por ejemplo, en los ácidos nucleicos contenidos en las células, son muy conocidos y están descritos en la técnica. Un tampón de lisis preferido utilizado en el método *AffiSelect* que implica células eucariotas contiene proteinasa K, que digiere la proteína y puede retirar las histonas del DNA antes de la etapa de detección. También podrían incluirse otras proteasas en los tampones de lisis utilizados en el método *AffiSelect*.

Como se ha descrito anteriormente la PCR es el método preferido de detección en el método *AffiSelect*. Sin embargo, podrían utilizarse otros métodos apropiados de detección del resto indicador, por ejemplo, hibridación con sondas, perlas fluorescentes, perlas de diferentes tamaños, etc. (véase anteriormente). La PCR es el método preferido debido a su alta sensibilidad (incluso puede detectarse un ligando (o célula) utilizando la PCR) y también debido a que permite la obtención de información sobre el ligando, por ejemplo, la información de las secuencias (si, por ejemplo, el ligando está asociado al ácido nucleico que lo codifica) o la identificación del ligando si, por ejemplo, los ligandos están marcados con moléculas de DNA que permiten la identificación del ligando, por ejemplo, marcados con moléculas de DNA de diferentes tamaños o marcados con moléculas de DNA con etiquetas de secuencias específicas que pueden utilizarse para identificar específicamente al ligando.

Convenientemente la PCR se realiza en solución (aunque podría también realizarse en una fase sólida) y la presencia o ausencia de un producto de PCR ser detectada por métodos estándares, tal como sobre un gel de agarosa (por ejemplo, el sistema E-gel 96, Invitrogen, hace posible analizar 96 muestras en 20-30 minutos). En general las muestras se mezclan bien antes de realizar la PCR (u otra etapa de detección).

Los cebadores para la PCR apropiados para amplificar toda o una porción del resto indicador se seleccionan de acuerdo con la secuencia del resto indicador por métodos muy conocidos y descritos en la técnica. Si el contenido de ácido nucleico de los pocillos de ensayo es apropiado, por ejemplo, si el ligando está codificado por ácido nucleico que ha sido transfectedo en células utilizando un vector de expresión apropiado (que contiene un resto indicador apropiado) o el ligando está asociado al DNA que lo codifica, pueden seleccionarse los cebadores para la PCR de modo que amplifiquen el ácido nucleico que codifica la secuencia del ligando así como el resto indicador. Esto puede ser ventajoso ya que los productos de la PCR pueden ser clonados directamente en un vector apropiado para su secuenciación, dando con ello como resultado la identificación de la secuencia del ligando.

La detección de una señal positiva, por PCR o de cualquier otra forma, es indicativa de fases sólidas que requieren más investigación. Por ejemplo, si la PCR se realiza en solución en los pocillos de una placa de ensayo, una señal positiva es indicativa de que el pocillo o pocillos en cuestión contiene al menos una pareja de unión potencial para un ligando (entidad diana) que puede someterse luego a un análisis y una investigación adicionales. Por ejemplo, las colonias bacterianas (u otros miembros de la genoteca) presentes en ese pocillo pueden someterse a un cribado minucioso, por ejemplo, por ELISA en células para identificar la colonia (miembro de la genoteca) que expresó la pareja de unión candidata para el ligando. Luego pueden realizarse análisis apropiados para identificar y caracterizar mejor la pareja de unión a nivel de gen y proteína.

Una señal positiva, generada por PCR o de otra manera, se determina convenientemente por comparación con una señal de fondo o una señal negativa conocida. Medios y métodos para medir y comparar dichas señales positivas, de fondo y/o negativas son muy conocidos por los expertos en la técnica. En realizaciones en las que las entidades dianas son módulos de la superficie celular, las señales negativas preferidas para comparación se proporcionan realizando el cribado en células no pertinentes o negativas, por ejemplo, células que no expresan las entidades dianas en sus superficies o expresan las entidades dianas sólo a bajos niveles.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos con referencia a las siguientes Figuras en las que:

La Figura 1 muestra el análisis por el FACS de clones de anticuerpos candidatos 1 (scFv1) y 2 (scFv2) seleccionados por los métodos de la presente invención en células de tumores mamarios y demuestra que ambos de estos clones se unen a células de tumores mamarios demostrando con ello que los antígenos dianas para ambos de estos clones se expresan en células de tumores mamarios.

La Figura 2 muestra una tabla de los resultados de análisis por el FACS para determinar la unión de los clones de anticuerpos candidatos 1 (columna 2) y 2 (columna 1) a diferentes líneas celulares. Los resultados muestran que el clon 1 es específico de las líneas de células de carcinoma de mama ensayadas mientras que el clon 2 se une a las líneas celulares de tumores de diferente origen.

La Figura 3 muestra el ELISA de fagos policlonales en la línea de células de carcinoma de pulmón A-549 con diluciones de los fagos después de las rondas de cribados 1-4 (R1-R4) utilizando 2 lavados y centrifugación de la fase orgánica (org) y perlas magnéticas revestidas con lectina (perlas).

La Figura 4 muestra un ejemplo de los resultados de la PCR del método *AffiSelect* que muestra el DNA de beta-actina amplificado en los casos en los que la expresión de scFv ensayada se estaba uniendo a células [A-549, HUVEC y leucocitos de sangre periférica (abreviadamente en lo sucesivo PBL por la expresión inglesa *Peripheral blood Leukocytes*)]. Los resultados de las mismas muestras de expresión de scFv se muestran (en el mismo orden) en los tres tipos de células. Las flechas señalan las muestras de expresión de scFv que mostraban la amplificación del DNA específico de tumores.

La Figura 5 muestra un resultado del análisis por FACS de uno de los scFv encontrados después de rondas de cribados utilizando 2 lavados y centrifugación de la fase orgánica. Los scFv se analizaron en los mismos tipos de células que los utilizados en las etapas de rondas de cribados y rondas de cribados previas (A-549, HUVEC y PBL).

La Figura 6 muestra un resultado de cribado por filtración para la identificación de antígenos con scFv 2. Se indican cinco muestras de expresión del cDNA de tumores (círculos) con señales de fuerte unión hacia el filtro revestido de scFv 2. Estas muestras eran negativas en un filtro revestido de PBS/BSA al 3% (no mostrado).

## **EJEMPLOS**

### **Materiales y métodos**

#### Células

Para los experimentos de rondas de cribados se utilizaron dos líneas de células de carcinoma de mama (PM -1 y MT-1, proporcionadas amablemente por el Department of Tumorbiology, Norwegian Radium Hospital (DNR), Oslo, Noruega), líneas de células de carcinoma de pulmón (A-549, ATCC CCL-185, proporcionadas amablemente por Viventia Biotech Inc.; SW900 ATCC HTB-59, proporcionada amablemente por el Department of Tumorbiology, DNR) y una línea de células endoteliales (HUVEC, ATCC CRL-1730, proporcionada amablemente por Viventia Biotech Inc.). Ambas líneas de células de carcinoma de mama se cultivaron en medio RPMI-1640 (Cambrex) complementado con FCS al 10% (Gibco BRL), L-glutamina 2mM (Cambrex) y HEPES 10mM (Cambrex). Se cultivó A-549 en medio de Ham F12 (BioWhittaker) complementado con FCS al 10% y glutamina 2mM. La línea de células endoteliales se cultivó en medio RPMI-1640 complementado con FCS al 10%, 15 mg/l de suplemento del factor de crecimiento endotelial (Sigma) y 50 mg/l de heparina (Sigma). Las células se cultivaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% y atmósfera humidificada. Para cada experimento se lavaron las células con PBS, se recogieron con EDTA 1mM en PBS, se lavaron una vez con PBS y se contaron. Para los experimentos de rondas de cribado, las células se volvieron a poner en suspensión en PBS/BSA al 13% (Sigma) o PBS/leche desnatada al 4% (Merck).

Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBL) de sangre humana recién extraída o de las capas de leucocitos y plaquetas utilizando *Lymphoprep* (Axis-Shield; para los detalles véase el protocolo del fabricante). Se lavaron las células una vez con PBS, se contaron y se volvieron a poner en suspensión en PBS/BSA al 3% o PBS/leche desnatada al 4%.

#### Perlas magnéticas revestidas de lectina

Se acoplaron perlas epoxídicas M-450 (Dynal) con lectina (WGA: germen de trigo, *Triticum vulgare*; Calbiochem) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, las perlas epoxídicas se lavaron e incubaron posteriormente en un tampón de borato 0,1M, pH 8,5 con 10 µg de lectina/10<sup>7</sup> perlas que se sometieron a rotación durante una noche a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron tres veces con PBS/BSA al 0,1% y se conservaron a 4°C en PBS/BSA al 0,1%/azida de sodio al 0,02% a 4 x 10<sup>8</sup> perlas/ml.

#### Genoteca de expresión de scFv en fagos

Para los experimentos de rondas de cribados se utilizó una genoteca de scFv de IgM que se construyó a partir de PBL de 6 donantes sanos y se clonó en un sistema de expresión en fagémidos basados en pSEX 81 (Welschof et al., 1997, PNAS, 94:1902-1907, Løset, et al., 2005, *J. Immunol. Methods* 299:47-62) después de mover del extremo N el sitio HindIII del enlazador, dando como resultado una secuencia de enlazador de 21 aminoácidos.

#### Etapas de rondas de cribados/puesta en contacto

Para separar los fagos que se unen a las proteínas de células comunes, se incubaron 3,75 x 10<sup>12</sup> fagos (150 µL de una genoteca de aproximadamente 2,5 x 10<sup>13</sup> UFC/ml) con 2 x 10<sup>5</sup> – 2 x 10<sup>6</sup>/ml de células de origen no tumoral en un tubo cerrado que giraba durante 1 h a 4°C (= ronda previa de cribados negativa). Como reactivo de bloqueo se utilizaron PBS/BSA al 3% o PBS/leche al 4%.

En un proyecto se utilizaron PBL para la etapa de ronda previa de cribados negativa. Después de la ronda previa de cribado negativa los PBL se lavaron dos veces con solución de bloqueo, después de lo cual se incubaron la genoteca de fagos reducida más dos líquidos sobrenadantes del lavado con células de tumor de mama como se ha descrito antes (rondas de cribados).

En otro proyecto se realizaron dos etapas de rondas previa de cribados negativa una después de la otra. En una primera etapa de ronda previa pre-cribados, la genoteca se incubó con PBL como se ha descrito antes. Después de la primera ronda previa de cribados, se lavaron los PBL dos veces con solución de bloqueo, después de lo cual se incubaron la genoteca de fagos reducida más dos líquidos sobrenadantes de lavados con HUVEC en un tubo bloqueado que giraba durante 1-2 h a 4°C como una segunda etapa de pre-cribado negativo. Después de dos lavados de la segunda ronda previa de cribados negativa, el líquido sobrenadante más los líquidos sobrenadantes de lavado se incubaron con células de tumores de pulmón como se ha descrito antes (rondas de cribados).

Lavado/Separación

Se aplicaron cuatro métodos para separar los fagos libres de los fagos unidos a células:

- 1) Separación de la fase orgánica en una sola etapa de acuerdo con el método BRASIL (Giordano et al., 2001, *supra*):

5 Después de las rondas de cribados, 2 x 150  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células tumorales se extendieron en forma de capas directamente sobre la parte superior de 2 x 300  $\mu\text{L}$  de solución de fase orgánica (ftalato de dibutilo:ciclohexano 9:1 [v:v];  $d = 1,03 \text{ g ml}^{-1}$ ). Después de centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a la temperatura ambiente, los tubos se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido, el fondo del tubo se cortó en rodajas y el sedimento celular se transfirió a otro tubo (bloqueado).

- 10 2) Como el método 1, pero con una o dos etapas de lavado con 1 ml de PBS/BSA al 0,4% antes de la nueva puesta en suspensión en 300  $\mu\text{L}$  de PBS/BSA al 0,4% BSA y centrifugación de la fase orgánica.

- 3) Método clásico:

Después de las rondas de cribados, las células tumorales se centrifugaron (500 g, 5 minutos, 4°C) y el sedimento se lavó cinco veces con 1 ml de PBS/BSA al 0,4%.

- 15 4) Utilizando perlas magnéticas

Después de las rondas de cribados, las células tumorales se centrifugaron (500 g, 5 minutos, 4°C), se volvieron a poner en suspensión en PBS/BSA al 0,1% a  $5 \times 10^6$  células/ml y se incubaron con perlas revestidas de lectina (relación célula:perla 1:4) sometiéndolas a rotación durante 20 minutos a 4°C. Las perlas se lavaron 10 veces en 1 ml de PBS/BSA al 0,1% utilizando un imán y se volvieron a poner en suspensión en 200  $\mu\text{L}$  de PBS/BSA al 0,1%.

Infección

25 Se añadieron sedimentos o perlas de células a 10 ml de E. Coli XL 1 Blue en fase logarítmica y se incubaron a 37°C durante 15 minutos a 60 rpm, a continuación durante 45 min a 200 rpm. Las bacterias se extendieron a diferentes concentraciones sobre placas de caldo de Luria-TAG (caldo de Luria al que se había añadido 30  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina (T), 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (A) y glucosa G) 100 mM) para evaluación y sobre dos placas rectangulares anchas (243 x 243 x 18 mm; Nunc) para empaquetado posterior. Todas las placas se incubaron durante una noche a 37°C.

Empaquetado

30 Se recolectaron por rascado las bacterias de las dos placas anchas. Las bacterias se propagaron en un cultivo líquido y el fagémido en aquellas células se empaquetó en partículas de fago con el fago auxiliar M13 (Stratagene), durante una noche a 30°C. Al día siguiente, se precipitaron los fagos con PEG/NaCl y se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de PBS de los que se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de fagos (aproximadamente  $10^{13}$  UFC) para una nueva ronda de cribados.

ELISA de fagos policlonales

35 Después de un bloqueo de 30 minutos a 4°C con PBS/BSA al 3%, las células tumorales y los PBL se incubaron durante 1 hora a 4°C con 100  $\mu\text{L}$  de fagos (diluciones 1:10-1:10<sup>6</sup>) de cada ronda de cribados. Después de 3 lavados con PBS, se incubaron las células durante 1 hora a 4°C con 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-Fd de conejo (Sigma; 1:4000). Después de lavar 3 veces con PBS, se realizó el ELISA con anticuerpo Ig de cabra-anti-conejo (Dako; 1:4000) conjugado a peroxidasa de rábano picante (monoclonal (HRP) y el sustrato ABTS (Calbiochem). La absorción se midió a 405 nm. (Cuando era apropiado se usó una metodología similar para realizar los ensayos ELISA con un sólo fago en oposición a un fago policlonal).

40 Expresión y purificación de scFv en E. Coli

45 El DNA de ScFv procedente de la ronda de cribados que mostraba un aumento en la unión específica al tumor (ELISA del fago policlonal) se clonó en el vector de secreción pHOG21 (Kipriyanov et al., 1997, *J. Immunol. Methods*, 200: 67-77) y los clones de scFv individuales se expresaron en E. Coli XL-1-Blue, como se ha descrito anteriormente (Dörsam et al., 1997, *FEBS Letters*, 414: 7-13) o en un formato de 96 pocillos profundos (un volumen de 100-200 microlitros). Las expresiones en los pocillos profundos se realizaron durante una noche a 30°C con IPTG 1 mM (Sigma). Al día siguiente se centrifugaron las placas durante 10 minutos a 4000 rpm, 4°C, y los líquidos sobrenadantes (que contenían el scFv expresado) se utilizaron en otros experimentos. En el caso en el que las muestras de expresión se utilizaran en el método *AffiSelect*, la colección policlonal del DNA de scFv clonado se transformó en XL-1 Blue E.Coli competente y se cultivó en placas sobre bandejas para bioensayo de 22 x 22 cm con caldo de Luria-TAG (Corning). Se recogieron clones individuales utilizando el robot QPix2 (Genetix, Ltd., UK) en placas de 384 pocillos que contenían el medio de crecimiento caldo de Luria-TAG [30  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina (T), 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (A), 1% (p/v) de glucosa (G)] al que se había añadido glicerol a ~4% y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. Los clones individuales de scFv se volvieron a inocular en placas de 384 pocillos que contenían el medio caldo de Luria-TAG y se realizaron las expresiones con IPTG 100  $\mu\text{M}$ . Al día siguiente

se añadieron a cada pocillo (que contenía 100 µl de producto de la expresión) 50 µL de PBS/BSA al 3% antes de centrifugar de las placas.

Los scFv expresados se analizaron para determinar su unión a células utilizando 5 métodos diferentes:

1) ELISA de ScFv

5 Después de bloquear 30 minutos a 4°C con PBS/BSA al 3%, las células tumorales y los PBL se incubaron durante 1 hora a 4°C con scFv (100 µL de producto de la expresión de los pocillos profundos o 10 µg/ml de scFv purificados). Después de 3 lavados con PBS, se incubaron las células durante 1 hora a 4°C con 100 µL de anticuerpo anti-c-myc conjugado con HRP monoclonal de ratón (Invitrogen; 1:4000). Después de lavar 3 veces con PBS, se realizó el ELISA con el sustrato ABTS y se midió la absorción a 405 nm.

10 2) Sistema de detección celular 8200 (de Applied Biosystems).

15 5 µl de productos de la expresión de scFv en 96 pocillos profundos se analizaron en placas de 384 pocillos que contenían  $5 \times 10^4$  células tumorales (PM-1) o PBL y anti-c-myc-FMAT Blue (Applied Biosystems) o una combinación de anticuerpo anti-c-myc de ratón (Invitrogen; 1,25 µg/ml) más IgG-Alexa Fluor R647 anti-ratón de cabra (Molecular Sondas; 2,5 µg/ml). Después de 2-4 horas de incubación, se midió la unión del scFv a las células utilizando el sistema de detección celular 8200, con las intensidades de las señales de sólo la unión del anticuerpo secundario y el scFv irrelevante como controles negativos.

3) AffiSelect

20 5 µL de productos de la expresión de scFv en 96 pocillos profundos se analizaron en células tumorales (A-549), PBL y HUVEC aplicando el método *AffiSelect*. Para este fin, se sedimentaron  $2,2 \times 10^4$  células (1600 rpm, 4°C, 5 minutos) y se incubaron con agitación durante 1 hora a 4°C junto con 5 µL de muestra de la expresión y 45 µL de PBS/BSA al 3%. Las células se lavaron con 150 µL de PBS/BSA al 3% y se centrifugaron (1600 rpm, 4°C, 5 minutos). Después de la adición de 50 µL de anticuerpo anti-c-myc (Invitrogen; 1:500) a los sedimentos las placas se incubaron agitando durante 1 hora a 4°C.

25 Las células se lavaron dos veces como se ha descrito antes y se incubaron con agitación durante 1 hora a 4°C junto con 25 µL de suspensión de perlas (Dynal) de IgG de ratón *M-450 pan* de  $5 \times 10^6$  perlas/ml (relación células:perlas =1:5). Después de lavar las perlas dos veces con 100 µL de PBS/BSA al 3% utilizando un imán, se volvieron a poner en suspensión en 100 µL de PBS/BSA al 3% y se transfectaron a una placa para la PCR.

30 Las muestras de perlas se incubaron durante una noche a 55°C en 30 µL de tampón para PCR que contenía proteinasa K (200 µg/ml), 0,45% de Tween 20 y 0,45% de NP40, y se conservaron a continuación a -20°C hasta su uso. Después de inactivar con calor la proteinasa K durante 30 minutos a 95°C, las muestras se colocaron en un imán y se utilizaron 5 µL del líquido sobrenadante para la PCR con cebadores específicos de beta-actina humana. En este ensayo, la presencia de un producto de la PCR de beta-actina en un pocillo significa la posible presencia de un clon de expresión de scFv que se ha unido a células.

4) FACS

35 1-5 x  $10^5$  células se tiñeron durante 1 hora a 4°C con 50 µl del producto de expresión en pocillos profundos de scFv. Después de lavar 3 veces con 150 µl de PBS y centrifugar (1600 rpm, 5 minutos, 4°C), se incubaron las células con 50 µL de anticuerpo anti-c-myc conjugado con FITC (Invitrogen; 1:30) durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron 3 veces como se ha descrito antes, se fijaron con 200 µL de PBS/formalina al 1-2% (Sigma) y se conservaron a 4°C hasta que se midieron con una máquina FACS (Coulter).

5) Guava

40 Se tiñeron  $1 \times 10^5$  células con 50 µL del producto de la expresión en pocillos profundos de scFv como ha sido descrito para FACS. Para evitar su internalización, en algunos casos las células se fijaron con 50 µL de PBS/formalina al 1-2% (30 minutos, 4°C) y se lavaron tres veces con PBS (1600 rpm, 5 minutos, 4°C) antes de incubar las células con los productos de la expresión de scFv. La expresión enl scFv unido se realizó con un anticuerpo anti-c-myc conjugado con FITC como ha sido descrito en FACS o con una combinación de anticuerpo anti-c-myc (1 hora, 4°C; 5 µg/ml; Sigma) seguido por tres lavados con PBS como se ha descrito para FACS y una incubación con un anticuerpo IgG anti ratón conjugado con FITC (1 hora, 4°C; 1:200; Dako). Después de tres lavados con PBS y fijación como se ha descrito para FACS, las muestras se conservaron a 4°C hasta que se midieron con un *Guava EasyCyte* (Guava Technologies).

Experimentos de cribado con filtros celulares

Tiras reactivas

50 Para determinar la concentración óptima de las células para inmovilizarlas en membranas de celulosa (Schleicher & Schuell), se revistieron tiras reactivas (aproximadamente 6 x 4 cm) durante 2 horas a temperatura ambiente con diferentes cantidades de células ( $5 \times 10^4$  -  $5 \times 10^6$  células/ml) en PBS. Después de lavar dos veces con PBS, las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I de ratón (Dako; 1:600) durante 1 hora a la temperatura

ambiente. Las células revestidas se visualizaron por incubación con un anticuerpo Ig anti-ratón de conejo conjugado con HRP (Dako; 1:10.000) y detección por ECL (Amersham).

#### Matriz (biochip) de ensayo

5 Clones de scFv que han demostrado anteriormente que son positivos en ELISA de células se sometieron a un ensayo de cribado por filtración (Stacy et al., 2003, *J. Immunol. Methods*, 283:247-259). En resumen, los clones de scFv se distribuyeron sobre un filtro de nitrocelulosa. Después de expresión durante una noche con IPTG, los scFv se analizaron para determinar su unión al filtro revestido de células. Los filtros se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-MHC clase 1 de ratón (1:600) y la unión se visualizó por un anticuerpo anti-c-myc conjugado con HRP (1:10.000) y detección por ECL. Se analizaron cinco bloques diferentes (PBS/BSA al 2%, PBS/leche desnatada al 4%, SuperBlock (Pierce), Tampón de bloqueo de caseína (Sigma), BlotBlock al 2% (BDH)) para determinar su reducción en la señal de fondo.

#### Identificación de los antígenos

#### Construcción de la genoteca de cDNA tumoral y rondas de cribados

15 Se construyó una genoteca de expresión de cDNA en fagos como se ha descrito antes (Fossa et al., 2004, *Cancer Immunol. Immunother.*, 53:431-438) a partir de la línea de células tumorales SW900. Para encontrar el antígeno que corresponde a un scFv de interés, se realizó una bio-ronda de cribados en tubos con superficie maxisorp revestidos de scFv (Nunc). En resumen, se revistieron tubos con superficie maxisorp haciéndolos girar durante una noche a 4°C con 10 µg/ml de scFv en PBS/BSA al 3% o PBS/leche al 4%. Al día siguiente se bloqueó la genoteca de expresión de cDNA en fagos durante 15 minutos en PBS/BSA al 3% o PBS/leche al 4% antes de añadirla a los tubos revestidos de scFv. Después de incubar la genoteca haciéndolas girar durante 2 horas a la temperatura ambiente, se lavaron los tubos diez veces con PBS/Tween al 0,05% seguido de 10 lavados con PBS. Se eluyeron los fagos de unión incubando los tubos 5 minutos haciéndolos girar con 500 µL de TEA 100 mM (Sigma). Después de neutralizar los fagos eluidos con 500 µL de Tris-HCl 1M, pH 7,5, se utilizaron 500 µL para la infección de 10 ml de XL1-Blue (como se ha descrito antes). Después de empaquetarlos como se ha descrito anteriormente, se utilizaron los fagos para una nuevas rondas de cribados en tubos revestidos de scFv. Los fagos recubiertos procedentes de 3 rondas de cribado se analizaron con un ELISA de fagos policlonales (véase anteriormente) en placas con superficies maxisorp revestida de scFv (Nunc).

#### Cribado por filtración de clones de cDNA tumorales expresados

30 El cDNA tumoral procedente de las rondas de cribados que mostró un aumento en la unión específica a scFv (ELISA de fagos policlonales) se amplificó por PCR y se clonó en un vector de secreción modificado pHOG21 que contenía una etiqueta HA. Los clones de cDNA tumorales se dispusieron sobre un filtro de nitrocelulosa y después de expresión durante una noche con IPTG se determinó su unión a un filtro revestido de scFv (de Wildt, RM, et al., *Nat. Biotechnol.* 2000, 18(9), 989-994). Se incubaron los filtros con un anticuerpo monoclonal anti-HA de ratón (0,2 µg/ml; Roche) y se visualizó la unión por un anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado con HRP (1:10000; Dako) y detección por ECL.

#### **Ejemplo 1- Ensayo por el método BRASIL**

35 Se centrifugaron dos líneas de células de cáncer de mama y PBL a través de una fase orgánica después de una incubación de 1-2 horas con la genoteca de fagos y se analizó su recuperación en la capa acuosa (fase superior) y en la fase orgánica (sedimento) después de centrifugación de la fase orgánica. Como control negativo se centrifugaron  $10^{11}$  fagos para evaluar el número de fagos libres que se deslizaban a través de la fase orgánica.

40 Se analizó la recuperación después de rondas de cribados en líneas de células tumorales humanas (PM-1 y MT-1) y PBL. Resultó que los PBL tenían que haber sido aislados recientemente. Los PBL descongelados procedentes de una parte alícuota congelada tienden a ser pegajosos durante el procedimiento de cribado. Después de centrifugación se encontraron en el sedimento celular de la fase orgánica (PM-1) al 75%, (MT-1) al 97% y (PBL) al 71%. Estos porcentajes son demasiado altos para tener un significado biológico: se espera que sólo un pequeño porcentaje de una genoteca completa de anticuerpos no sometidos a experimentación previa se una a proteínas de la superficie celular de un tipo de células. El número de fagos libres que se deslizaban a través de la fase orgánica era sólo  $2 \times 10^{-5}\%$  y pueden ignorarse en el futuro.

45 Por tanto, se llegó a la conclusión de que el método BRASIL no era útil como tal: utilizando sólo la centrifugación de la fase orgánica como la etapa de separación, se encontraron muchas uniones (no específicas) en el sedimento celular.

#### **Ejemplo 2 – Comparación de cuatro métodos para separar los fagos libres de los fagos unidos a las células**

1) Separación de la fase orgánica en una sola etapa basada en el método BRASIL (Giordano et al., 2001):

50 Después de las rondas de cribados,  $2 \times 150$  µL de suspensión de las células tumorales se extendieron en capas directamente sobre la parte superior de  $2 \times 300$  µL de solución de la fase orgánica (ftalato de dibutilo:ciclohexano 9:1 [v:v];  $d = 1,03 \text{ g ml}^{-1}$ ). Después de centrifugación a 10,000 g durante 10 minutos a la temperatura ambiente, los tubos se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido, el fondo del tubo se cortó en rodajas y el sedimento celular se transfirió a otro tubo (bloqueado).

2) Como el método 1, pero con una o dos etapas de lavado con 1 ml de PBS/BSA al 0,4% antes de la nueva puesta en suspensión en 300  $\mu$ L de PBS/BSA al 0,4% BSA y centrifugación de la fase orgánica.

3) Método clásico:

Después de las rondas de cribados, las células tumorales se centrifugaron (500 g, 5 minutos, 4°C) y el sedimento se lavó cinco veces con 1 ml de PBS/BSA al 0,4%.

4) Perlas magnéticas:

Después de las rondas de cribados, las células tumorales se centrifugaron (500 g, 5 minutos, 4°C), se volvieron a poner en suspensión en PBS/BSA al 0,1% y se incubaron con perlas revestidas de lectina (relación células:perlas 1:4) haciéndolas girar durante 20 minutos a 4°C. Las perlas se lavaron 10 veces en 1 ml de PBS/BSA al 0,1% utilizando un imán y se volvieron a poner en suspensión en 200  $\mu$ L de PBS/BSA al 0,1%.

En un primer experimento se comparó el nuevo método (2) con el método BRASIL (1) y el método clásico de 5 etapas de lavado (3). Las células tumorales utilizadas fueron la línea de células de carcinoma de mama PM-1 y se realizó una ronda previa de cribados negativa con PBL como se ha descrito en el apartado Materiales y Métodos.

En otro experimento se realizó una comparación directa entre el método (2) y el uso de perlas magnéticas revestidas de lectina para separar los fagos libres de los fagos unidos a células (método 4). Las células tumorales utilizadas fueron la línea de células de carcinoma de pulmón A-549 y se realizó una ronda previa de cribados negativa con PBL y HUVEC como se ha descrito en el apartado Materiales y Métodos.

#### Comparación de los métodos 1, 2 y 3:

Después de 4 rondas de cribados, separación (utilizando el método 1, 2 o 3, según proceda), infección y empaquetado, se realizó por separado un ELISA de fagos monoclonales de los fagos recuperados de cada una de las 4 rondas, para detectar un aumento de la unión de los fagos a las células tumorales pero no a los PBL. Después de sólo 2 rondas de cribados se observó dicho aumento con el método 2, mientras que los métodos 1 y 3 mostraron un enriquecimiento después de 4 y 3 rondas, respectivamente. Después de subclonación en el vector de expresión pHOG21 se realizó un ELISA de scFv con 95 clones procedentes de la ronda 3 de cada método. El método 2 resultó ser el mejor método considerando no sólo el momento del enriquecimiento (ronda 2) sino también la cantidad de agentes de unión de scFv (39/95) en comparación con el método 1 (ronda 4, 11/94) y con el método 3 (ronda 3, 27/95).

#### Comparación de los métodos 2 y 4:

Los resultados del ELISA de fagos policlonales revelaron que después de sólo 2 rondas de cribados se observó un aumento en la unión a los fagos a las células tumorales tanto con el método 2 como con el 4. En contraste, el método 2 mostró un aumento en el enriquecimiento (la curva va subiendo después de diluir los fagos  $10^{-2}$ ) después de la tercera y cuarta ronda de cribados cuando se compara con el método 4 (Figura 3).

Por tanto, el método 2 (es decir, el método de la invención) presenta ventajas significativas sobre los métodos de la técnica anterior, especialmente en términos de poder realizar menos rondas de cribados e identificar más clones positivos.

#### **Ejemplo 3 – Proyectos de rondas de cribado satisfactorias utilizando separación de la fase orgánica después de 1 ó 2 lavados.**

Dos proyectos de rondas de cribados aplicaron satisfactoriamente la combinación de 1 ó 2 lavados y la separación de la fase orgánica:

##### 1) Proyecto con carcinoma de mama

Para las rondas de cribados se utilizó una línea de células de carcinoma de mama (PM-1) con una genoteca de expresión en scFv de fagos. La ronda previa de cribados negativa se realizó en PBL humanos recientemente aislados como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos. En estos experimentos se investigó el efecto de realizar el lavado antes de la centrifugación de la fase orgánica y su comparación con el método clásico (véase anteriormente).

Después de un lavado y centrifugación de la fase orgánica, se analizaron fagos simples así como scFv procedentes de la ronda 3 del cribado para determinar su especificidad en las medidas de ELISA celular y FACS frente a PBL y a la línea de células tumorales. Se encontraron tres clones únicos y específicos de la línea de células tumorales (clones 1, 2 y 3). Analizando las expresiones de un solo scFv con el sistema de detección celular 8200 y medidas con Guava, se encontraron cinco clones más únicos y específicos de la línea de células tumorales (datos no mostrados). Investigaciones más rigurosas de los tres primeros clones en el Norwegian Radium Hospital (DNR, Oslo, Noruega en experimentos en FACS mostraron que un clon de scFv (1) se une principalmente a líneas de células de carcinoma de mama, mientras que otro clon de scFv (2) se une a líneas de células tumorales de diferente origen, por ejemplo líneas de células de tumores en la próstata, el pulmón, colo-rectal y glioblastomas (Figuras 1 y 2). Los resultados han demostrado también que los antígenos dianas para ambos clones en las células tumorales no son Her-2/neu, EGF-R ni CEA, sugiriendo con ello que podría reconocerse

un nuevo antígeno tumoral. Los datos de FACS y de microscopía confocal mostraron que en este caso tanto el clon 1 como el 2 de scFv se unían a antígenos internalizantes.

Por tanto, puede observarse que los métodos de la invención pueden usarse para identificar las parejas de unión específicas (en este caso fragmentos de anticuerpos scFv) para moléculas expresadas sobre las superficies de las células.

## 5 2) Proyecto de carcinoma de pulmón

10 Para la ronda de cribados se utilizó una línea de células de carcinoma de pulmón (A-549) con una genoteca de expresión enl scFv del fago. Se realizó una ronda previa de cribados negativa en PBL humanos recientemente aislados y una línea de células endoteliales (HUVEC) como se ha descrito en el apartado Materiales y Métodos. En estos experimentos se realizó una comparación directa entre el método que utilizaba 2 lavados antes de la centrifugación de la fase orgánica (método 2) y el método que utilizaba perlas magnéticas revestidas de lectina para la separación de los fagos libres de los unidos a células (método 4).

15 Después de dos lavados y centrifugación de la fase orgánica, se analizaron los productos de expresión de scFv procedentes de la ronda 3 de cribados para determinar su especificidad en *AffiSelect* y ELISA celular frente a PBL, HUVEC y la línea de células tumorales A-549 (figura 4). Como se muestra en el ejemplo de la Figura 4, ocho muestras de la expresión de scFv analizadas frente a la línea de células tumorales mostraron DNA de beta-actina amplificado por PCR, mientras que no se observó dicho producto con HUVEC y PBL. Esto muestra que en este caso, 8 de las muestras de scFv analizadas estaban unidas a la línea de células tumorales, pero no a HUVEC o PBL. Después de confirmar la unión específica a las líneas de células tumorales por medidas con FACS (la Figura 5 muestra un clon ilustrativo) y Guava (datos no mostrados), se encontraron diez clones únicos y específicos de las líneas de células tumorales.

20 Por tanto, puede observarse de nuevo que los métodos de la invención pueden aplicarse para identificar parejas de unión específicas (en este caso fragmentos de anticuerpos scFv) para moléculas expresadas en las superficies de las células.

### **Ejemplo 4 – Ensayo de diferentes marcas de tubos para PCR**

25 Se analizaron tubos de paredes finas, de 0,5 ml, para PCR para determinar su estabilidad durante la centrifugación de la fase orgánica y el corte después de su congelación.

Los mejores tubos analizados fueron tubos Eppendorf de paredes finas de 0,5 ml para PCR (Nº 0030 124.502) y Axygen PCR-05-C (Nº 321-05-053). Después de congelar la fase orgánica, los tubos tenían que ser cortados justo por encima de la zona en forma de V para evitar la rotura del tubo.

### **Ejemplo 5 – Efecto de la fase orgánica sobre la infectividad de los fagos**

30 Se utilizaron  $10^8$  y  $10^{11}$  fagos junto con 100 y 200  $\mu$ L de fase orgánica para infectar 10 ml de E. Coli XL1-Blue (Stratagene) en fase logarítmica. Se incubaron bacterias a 37°C durante 15 minutos a 60 rpm, a continuación durante 45 minutos a 200 rpm y se extendieron a diferentes concentraciones sobre placas con caldo de Luria-TAG. Después de incubación durante una noche a 37°C se contó el número de colonias.

35 Trabajando con un título de fagos bajo ( $10^8$  en comparación con  $10^{11}$ ), la presencia de fase orgánica tenía un efecto negativo (reducción de aproximadamente el 50%) sobre el índice de infectividad. Dicho efecto no se observó con un título de fagos alto.

40 Como puede observarse de los resultados y análisis de la presente memoria, con los métodos descritos para cribar genotecas de expresiones de anticuerpos con células, el cribado de anticuerpos no depende de la disponibilidad de antígeno purificado y/o recombinante e incluso pueden descubrirse nuevos antígenos específicos de tipos de células. La combinación de rondas de cribados en células aplicando los métodos de la invención en combinación con el cribado por filtros celulares u otros métodos, tales como *AffiSelect* o el sistema de detección celular 8200 (de Applied Biosystems), proporciona así una plataforma tecnológica para el cribado y la selección con alto rendimiento de anticuerpos frente a antígenos de la superficie celular.

### **Ejemplo 6 – Identificación de dianas de clones específicos de tumores a partir de proyectos de rondas de cribados satisfactorias utilizando la separación de la fase orgánica después de 1 ó 2 lavados.**

45 Se utilizaron dos clones de scFv (clon 1 y 2, véase las Figuras 1 y 2) procedentes del proyecto de rondas de cribado de carcinoma de mama aplicando una centrifugación de la fase orgánica después de 1 lavado para la identificación de sus entidades dianas.

50 Para la identificación de dianas se construyó una genoteca de expresión enl cDNA de fagos tumorales a partir de una línea de células positivas (SW900; antígenos que se expresan altamente para scFv tanto 1 como 2). Esta genoteca se utilizó a continuación para ronda de cribado en tubos, revestidos con scFv 1 y 2, respectivamente. Después de 3 rondas de cribados, se analizaron los productos de la expresión de clones de cDNA tumorales sencillos por cribado por filtración para determinar su unión a filtros revestidos de scFv 1 y 2.



En caso de identificación de antígenos de scFv 2, se encontraron que 5 clones de cDNA tumorales se unían al filtro revestido de scFv 2 (Figura 6). El análisis de las secuencias demostró que los 5 clones corresponden a la misma secuencia de nucleótidos.

5 En el caso de identificación de antígenos de scFv 1, 12 clones de cDNA tumorales mostraron su unión al filtro revestido de scFv 1 (datos no mostrados).

La unión de los clones de cDNA tumorales al scFv se verificó por ELISA de placas revestidas de scFv. Además, tanto los scFv 1 como 2 se utilizan ahora en experimentos de inmunoprecipitación, 1 y PAGE 2D, extracción peptídica y análisis por espectrometría de masas.

10 Por tanto, puede observarse que los métodos de la invención pueden ser utilizados además para identificar entidades dianas (en este caso antígenos dianas) que interactúan con las parejas de unión identificadas por los métodos mejorados de separación de la fase orgánica descritos en la presente memoria.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de cribar una genoteca de moléculas para identificar o seleccionar uno o más de sus miembros que son parejas de unión candidatas para una o más entidades dianas:
- 5 (a) poner en contacto una genoteca de expresión con una o más entidades dianas;
- (b) someter dichas entidades dianas a al menos una etapa de lavado;
- 10 (c) separar las entidades dianas que han llegado a unirse a uno o más miembros de la genoteca de expresión de los miembros no unidos de la genoteca de expresión mediante separación a través de una fase orgánica, separando de este modo las parejas de unión candidatas para dichas entidades dianas de otros miembros de la genoteca, en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos y en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que se une a una fase sólida.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión de anticuerpos.
- 15 3.- El método de la reivindicación 2, en donde dicha genoteca de expresión de anticuerpos comprende anticuerpos scFv.
- 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha molécula de la superficie celular es proporcionada, como un componente de células completas o una fracción de membrana de células.
- 20 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha entidad diana es un antígeno.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas células se transforman o transfectan con ácido nucleico que codifica dicha entidad diana o se transforman o transfectan con ácidos nucleicos que codifican una genoteca de entidades dianas o son células que sobre-expresan dicha entidad diana.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichas células son células eucariotas.
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas células están asociadas con un estado morbozo.
- 25 9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichas células son células cancerosas.
- 10.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 9, en donde dicha fase sólida es una fase sólida en forma de partículas.
- 30 11.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde en la etapa (a) se proporciona más de una entidad diana.
- 12.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde en la etapa (b) se llevan a cabo al menos 2, al menos 3, o al menos 4 etapas de lavado.
- 13.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde en la etapa (b) se llevan a cabo 1, 2, 3 o 4 etapas de lavado.
- 35 14.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicha separación a través de una fase orgánica se lleva a cabo por centrifugación.
- 15.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho método comprende además una o más rondas previas de cribados realizadas antes de la etapa (a) del método, en donde dicha genoteca de expresión se pone en contacto con una o más entidades no relevantes.
- 40 16.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde las etapas (a) a (c) se repiten una o más veces.
- 17.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde las etapas (a) a (c) se repiten 1, 2 o 3 veces.
- 45 18.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde dichas entidades dianas que se unen a uno o más miembros de la genoteca de expresión se someten a un análisis posterior.
- 19.- El método de la reivindicación 18, en donde dicho análisis posterior es un análisis posterior de las parejas de unión candidatas y/o entidades dianas.

20.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende además una etapa en donde dichas parejas de unión candidatas se desprenden, eliminan, eluyen o aíslan de dichas entidades dianas, o se expresan o producen en el aislamiento de dichas entidades dianas.

21.- El método de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde dicho análisis posterior de las parejas de unión candidatas comprende las etapas de:

- i) poner en contacto una o más de dichas parejas de unión en solución con una o más entidades dianas;
- ii) capturar las entidades dianas que han llegado a unirse a una o más de las parejas de unión candidatas en una fase sólida; y
- iii) detectar la presencia de una entidad diana, con lo cual se detecta la presencia de una o más parejas de unión candidatas para la entidad diana.

22.- El método de la reivindicación 21, en donde dicha entidad diana es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

23.- El método de la reivindicación 21 o la reivindicación 22, en donde dichas parejas de unión candidatas comprenden una etiqueta o marcador para facilitar la etapa de captura (ii).

24.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde dichas entidades dianas contienen o están asociadas con un resto indicador para facilitar la detección de las entidades dianas.

25.- El método de la reivindicación 24, en donde dicho resto indicador es una molécula de DNA.

26.- El método de la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular y dicho resto indicador es una molécula de DNA presente en las células sobre las cuales se expresa la entidad diana.

27.- El método de la reivindicación 25 o la reivindicación 26, en donde dicha molécula de DNA es un gen de mantenimiento endógeno o es un resto indicador exógeno.

28.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en donde dicha fase sólida en la etapa (ii) es magnética y preferiblemente en forma de partículas.

29.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 28, en donde dicha etapa de captura es facilitada por una interacción entre una molécula de captura en la fase sólida con una etiqueta o molécula asociada con la pareja de unión candidata.

30.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 29, en donde dicha etapa de detección se lleva a cabo detectando la presencia de resto indicador sobre o asociado con la entidad diana.

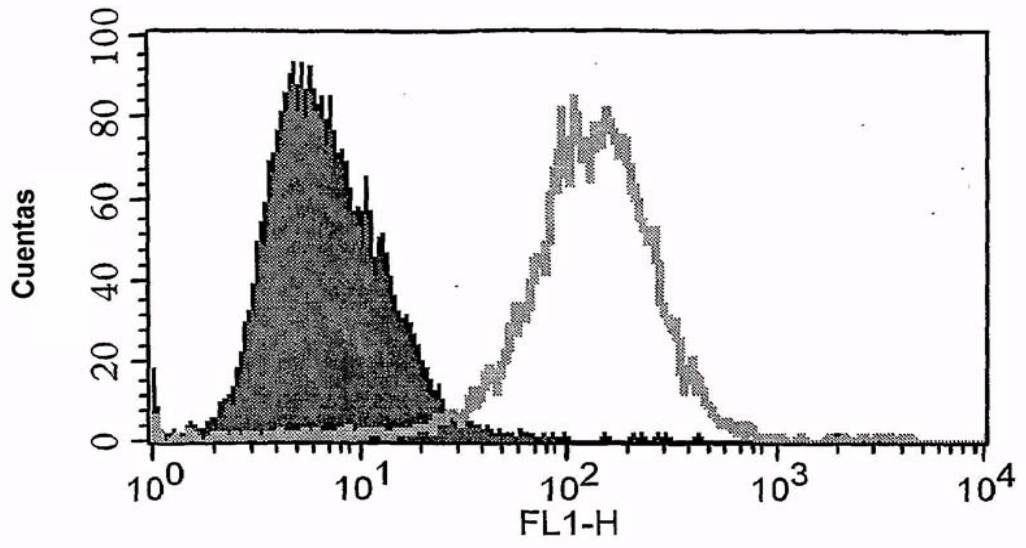
31.- El método de la reivindicación 30, en donde la etapa de detección es por PCR.

32.- Un método para aislar y/o identificar una entidad diana desconocida que comprende las etapas como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 y que comprende además:

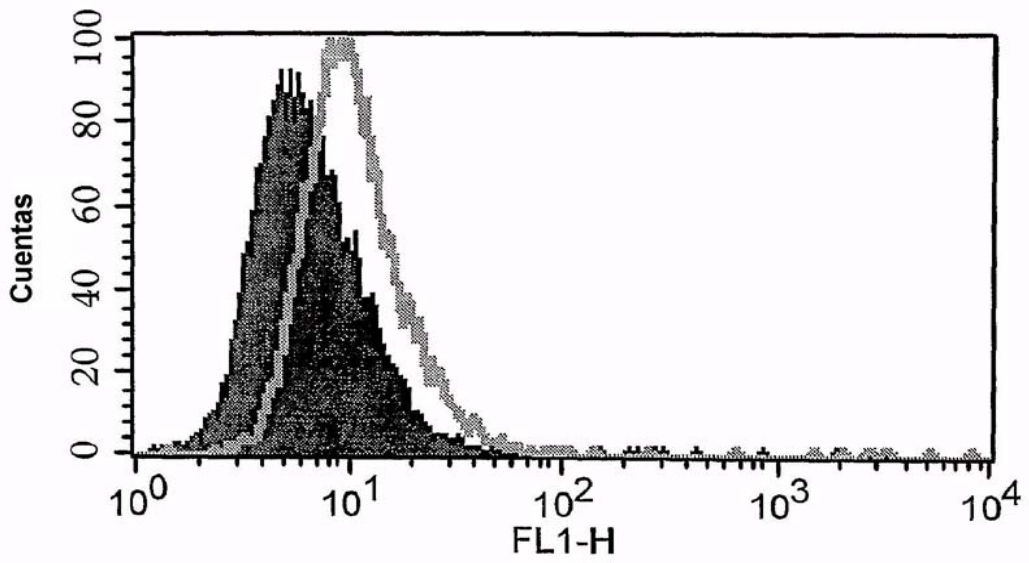
- (d) aislar una o más miembros de la genoteca de expresión que se unen a dicha entidad diana y
- (e) usar dicho miembro de genoteca para aislar y/o identificar la entidad a la cual se une, en donde dicha genoteca de expresión es una genoteca de expresión en fagos y en donde dicha entidad diana es una molécula de la superficie celular o una molécula que está unida a una fase sólida.

33.- Un método de seleccionar, identificar y/o aislar un miembro de una genoteca que es una pareja de unión específica para una entidad diana, o un método de seleccionar, identificar y/o aislar una entidad diana, de una genoteca de expresión, comprendiendo dicho método las etapas que se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 para seleccionar moléculas que presentan ciertas propiedades y opcionalmente (e) identificar y/o aislar el(los) miembro(s) relevantes de la genoteca que son parejas de unión específicas para la entidad diana y opcionalmente (f) usar dicho miembro de la genoteca para identificar y/o aislar la entidad diana a la que se une.

34.- El método de la reivindicación 32 o la reivindicación 33, en donde la etapa (e) de la reivindicación 32 o la etapa (f) de la reivindicación 33 comprende usar dicho miembro de la genoteca para cribar una genoteca de cDNA preparada a partir de células en las cuales se expresa la entidad desconocida.



*scFv 1*



*scFv 2*

**FIGURA 1**

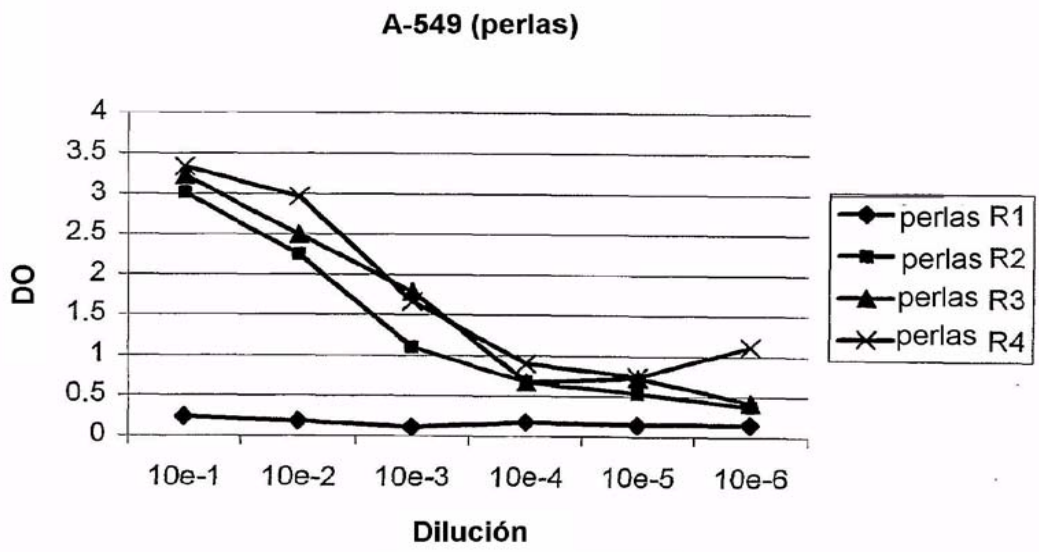
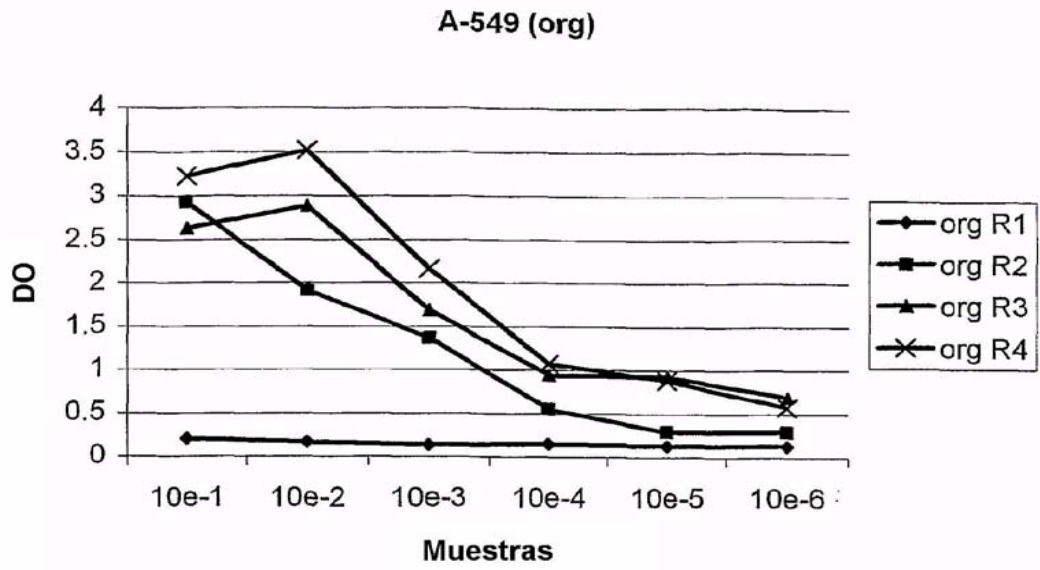
## Selección de anticuerpos basada en células (CBAS)

	1	2
Línea de cáncer de mama 1	P	P
Línea de cáncer de mama 2	P	P
Línea de cáncer de mama 3	P	N
Línea de cáncer de mama 4	P	P
Línea de cáncer de mama 5	P	P
Línea de cáncer de mama 6	P	P
Línea de cáncer de próstata 1	P	N
Línea de cáncer de próstata 2	P	N
Línea de glioblastoma 1	P	N
Línea de glioblastoma 2	P	N
Línea de cáncer de pulmón 1	P	N
Línea de cáncer de pulmón 2	P	N
Línea de melanoma 1	N	N
Línea de osteosarcoma 1	N	N
Línea de cáncer colo-rectal 1	N	N
Línea de cáncer colo-rectal 2	N	N
Línea de cáncer colo-rectal 3	P	N
Fibroblastos normales	N	N
Médula ósea normal	N	N
Médula ósea normal (mel) 1	N	N
Médula ósea normal (mel) 2	N	N

### ANÁLISIS FACs EN LÍNEAS CELULARES DIFERENTES

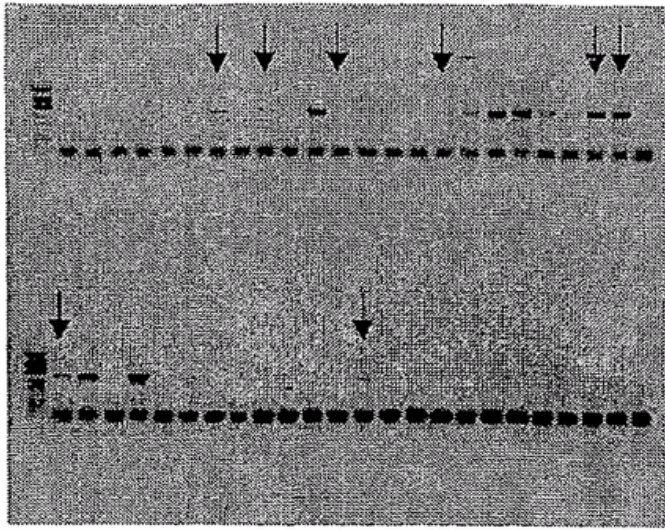
\* Las dianas de ambos scFv NO son  
Her-2/neu, EGF-R ni CEA

FIGURA 2

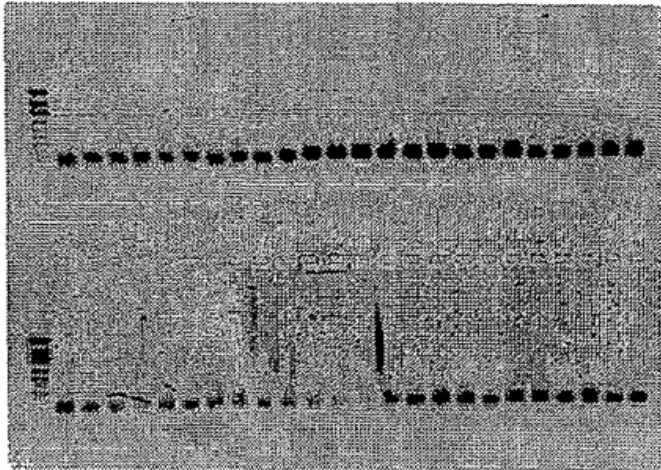


**FIGURA 3**

A-549



PBL



HUVEC

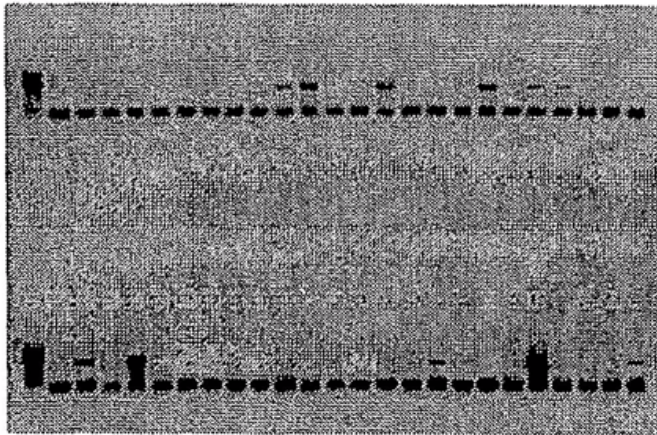


FIGURA 4

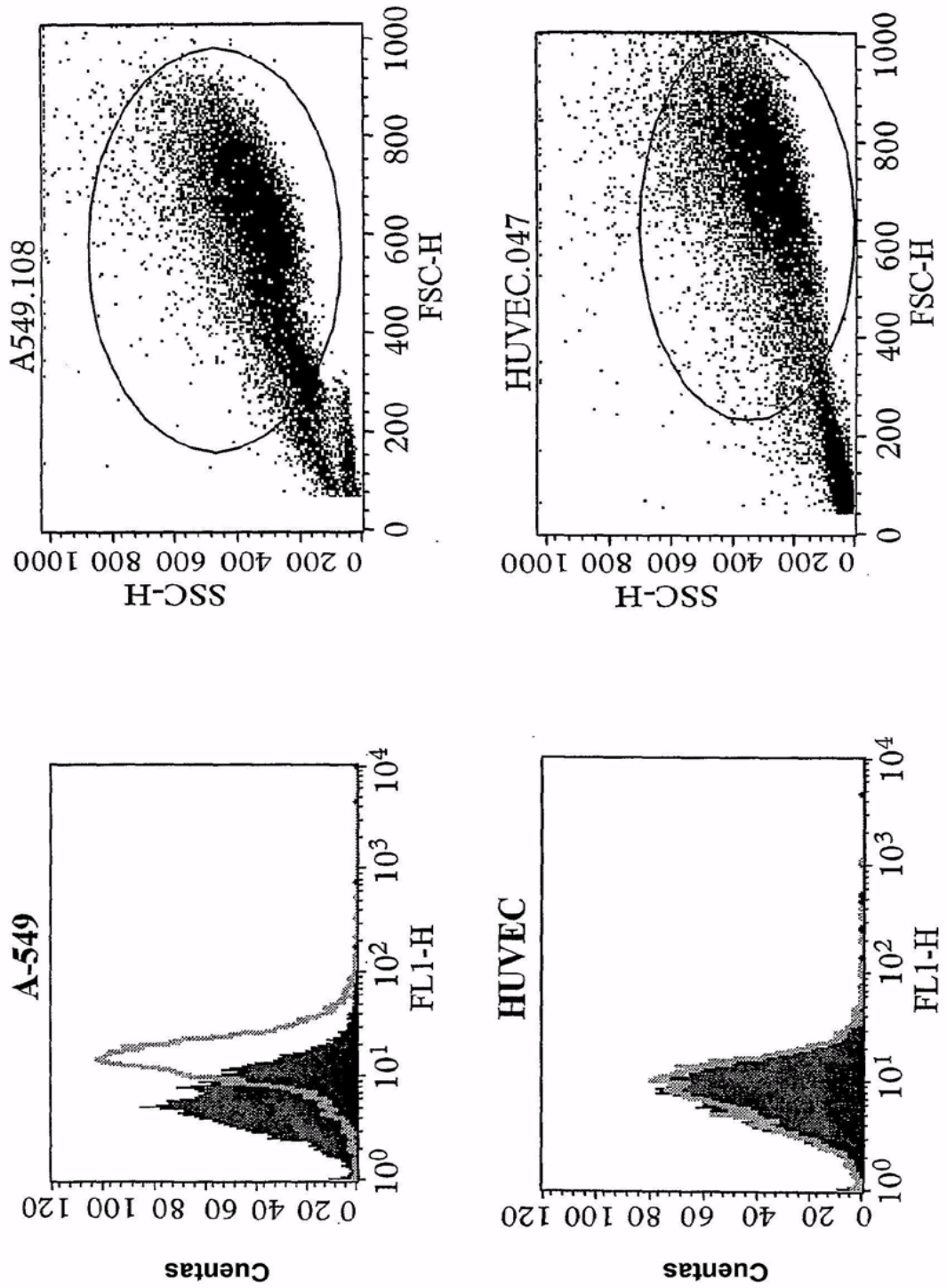
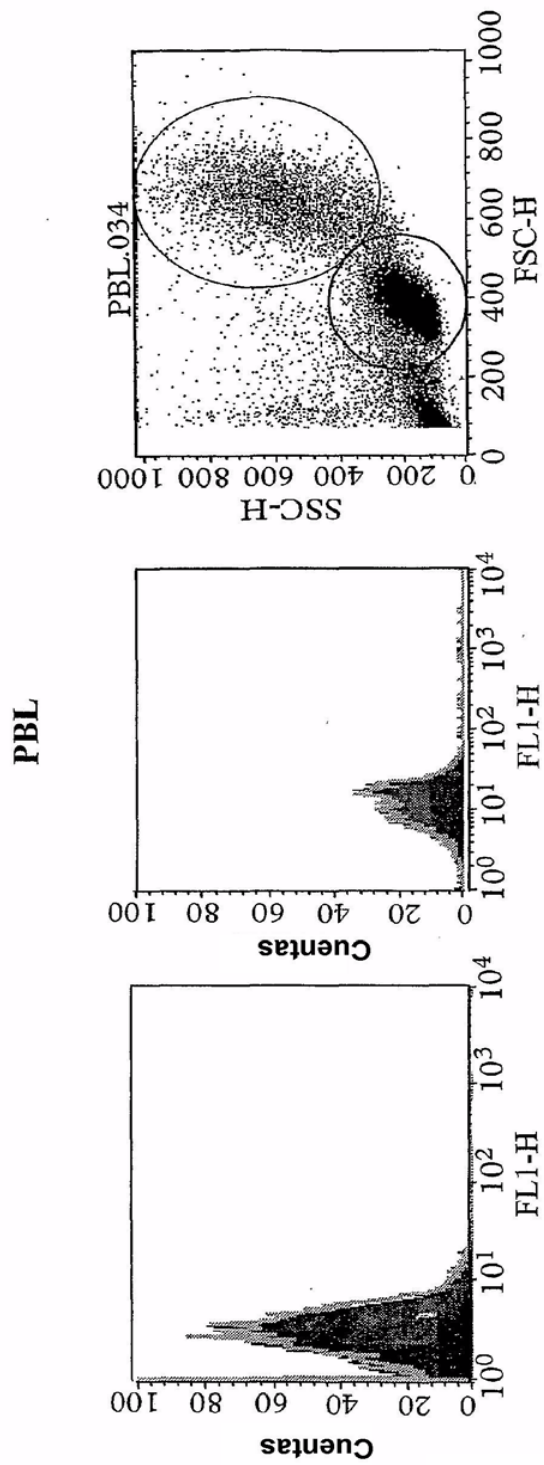
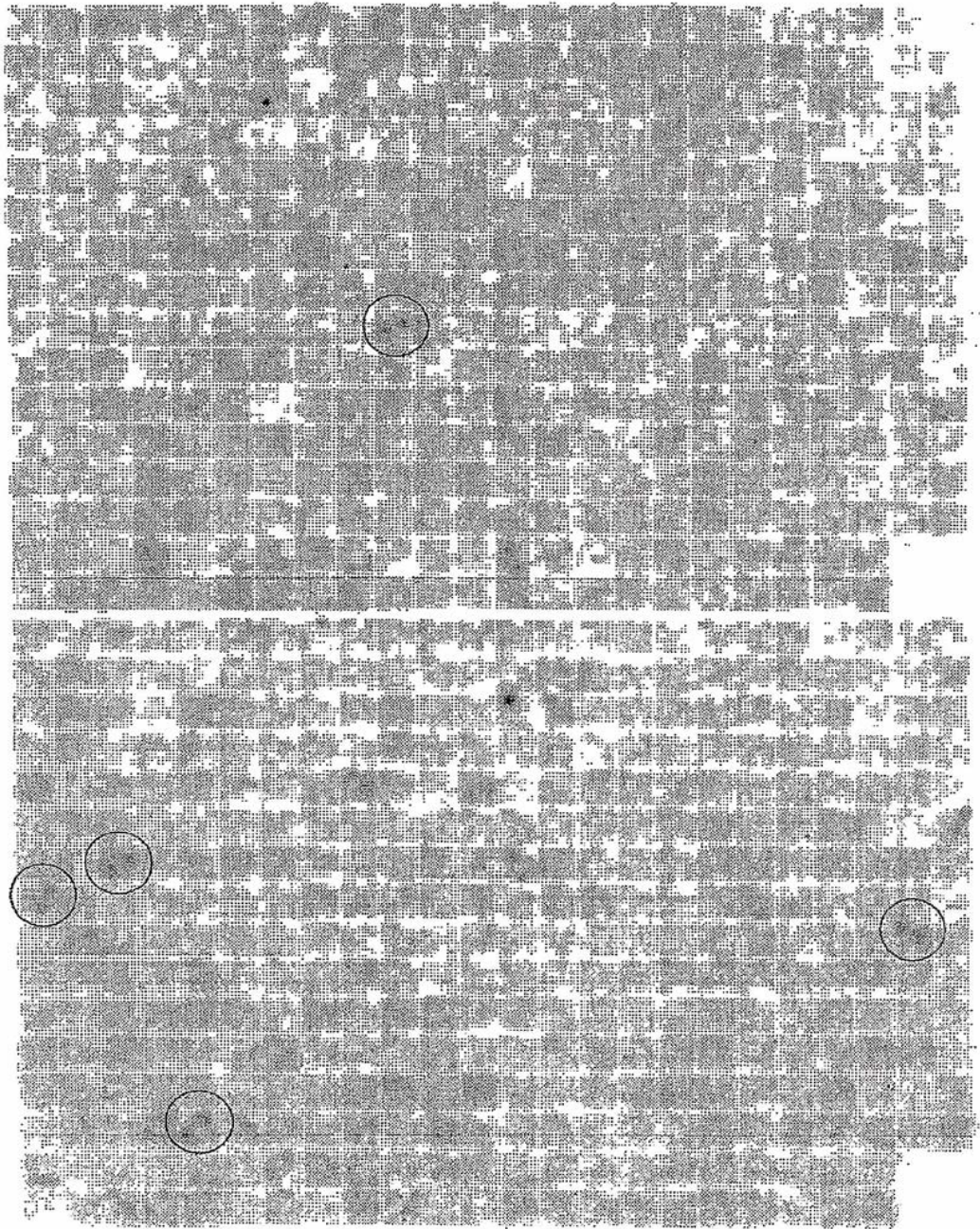


FIGURA 5a





**FIGURA 5B**



**FIGURA 6**