

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 623**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01990535 .5**
96 Fecha de presentación: **03.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1360207**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2003**

54 Título: **MATRICES DE PROTEÍNA DE DOMINIOS VARIABLES DE INMUNOGLOBULINA DE CADENA PESADA DE CAMELIDAE.**

30 Prioridad:
13.12.2000 EP 00311142

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
BAC IP B.V.
HUIZERSTRAATWEG 28
1411 GP NAARDEN, NL

72 Inventor/es:
DE HAARD, J. J. W.;
HERMANS, Pim;
LANDA, Ilse y
VERRIPS, Cornelis T.

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 368 623 T3

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

DESCRIPCIÓN

Matrices de proteína de dominios variables de inmunoglobulina de cadena pesada de Camelidae

Campo de la invención

5 [0001] La presente invención se refiere a matrices de proteína que comprenden una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de los mismos, la construcción de tales series y a métodos de uso de las mismas, por ejemplo, en la detección y el análisis paralelo de hasta un gran número de proteínas en una muestra.

Antecedentes de la invención

10 [0002] Gran parte de la investigación en biología de célula molecular está se está alejando del método "reduccionista" tradicional de aislamiento y caracterización de estructuras o moléculas individuales de una célula, hacia un más método más holístico, en el que las diversas funciones metabólicas de la célula en conjunto se relacionan con la suma de las moléculas presentes adentro (Lander & Weinberg, Science 287, 1777-1782 (2000); Lockhart & Winzeler, Nature 405, 827-836 (2000); Hughes et al, Cell 102, 109-126 (2000)). Se está haciendo cada vez más evidente, por ejemplo, que el progreso en la comprensión y, según corresponda, el diagnóstico, la administración o el tratamiento de una gama completa de condiciones que implican cambios en el metabolismo de las células en un organismo vivo se beneficia de la aplicación de métodos que proporcionan una imagen tan completa como sea posible de los cambios subyacentes tal como el modelo de expresión genética y de contenido de proteína en los diferentes compartimentos de la célula. Esto es cierto en parte porque la mayor parte de los genes o las proteínas puede ser hasta ahora desconocidas, de modo que no habría nada en el conocimiento existente para sugerir la investigación de su relevancia en el contexto de la condición de interés. Además, la condición, en todos los casos más simples, depende del efecto compuesto de cambios subyacentes múltiples, de modo que un punto de vista demasiado simplificado o, en aplicaciones prácticas, un diagnóstico impreciso o un tratamiento ineficaz podría originarse si se focaliza sólo en factores contribuyentes individuales.

25 [0003] En parte, el progreso en esta área es impulsado por los rápidos avances en la secuenciación del genoma, lo que ha conducido a la identificación de números inauditos de genes y productos genéticos, cuya existencia y papel en la célula frecuentemente no han sido reconocidos previamente (Goffeau et al, Science 274, 562-567 (1996); The C. elegans Sequencing Consortium, Science, 282, 2012-2018 (1998); Venter et al., Science 291, 1304-1351 (2001); Int Human Genome Sequencing Consortium, Nature 409, 860-921 (2001)). Un método para identificar cuál de estas proteínas puede ser importante en relación con un aspecto particular de la biología celular es comparar modelos de expresión de los genes que las codifican en diferentes tipos de célula, o bajo condiciones diferentes. Con este fin, ha habido considerable progreso en el desarrollo de métodos para la detección del perfil de expresión global de una célula, en lugar que la focalización en genes individuales, como se hizo típicamente en el pasado. Ha sido clave para esto el desarrollo de matrices de ADN, en las que gran número de secuencias de ADN se inmovilizan en una matriz bien definida en un soporte sólido. Estas matrices hacen posible caracterizar las cantidades de ARNm de gen específico presentes en una célula bajo un conjunto determinado de condiciones fisiológicas, por detección de la hibridación de especies individuales de ARNm para sus fragmentos de ADN correspondientes en la matriz. Los perfiles de expresión resultante proporcionan una manera muy potente de desarrollar nuevas perspectivas de las respuestas celulares a diferentes condiciones. Por ejemplo, este método ha sido usado para detectar cambios en la expresión de múltiples genes durante la tumorigénesis o el envejecimiento (Alizadeh et al., Nature 403, 503-511 (2000); Ly et al., Science 287, 2486-2492 (2000)).

40 [0004] No obstante, los cambios en niveles ARNm, en general, no se correlacionan directamente con cambios en los niveles de las proteínas que codifican, debido a diferencias en índices de traducción y estabilidad entre diferentes ARNm, al igual que diferentes índices de producción de las proteínas (Pandey & Mann, Nature 405, 837-846 (2000); Wilkins et al, 'Proteome Research: Frontiers in Functional Genomics' 1-243 (Springer, Berlin, 1997)). Puesto que son las proteínas las que en realidad facilitan y controlan la gran mayoría de los procesos que tienen lugar en la célula, es evidentemente importante poder complementar los métodos de perfilación de la expresión genética con métodos acompañantes que monitoreen directamente las diferencias en el contenido de proteína bajo diferentes condiciones fisiológicas, con un grado de sensibilidad y velocidad comparable a los alcanzables para el monitoreo de niveles de ARNm de control que usan las matrices de ADN.

50 [0005] Actualmente, el método para usado más frecuentemente para analizar la distribución de las proteínas en una célula es electroforesis bidimensional en geles. Sin embargo, este método no proporciona ni la sensibilidad ni la velocidad de la perfilación de ARNm con las con matrices de ADN. También está seriamente limitado en la resolución, de modo que incluso para una simple célula eucariótica tal como *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene sólo 6220 genes, los geles bidimensionales son incompletos, difíciles de reproducir y de interpretar. Por otra parte, casi siempre las proteínas abundantes enmascara n la presencia de proteínas menos abundantes, que son las proteínas implicadas en procesos de regulación importantes en la célula (Anderson & Andeson, Electrophoresis 17, 443-453 (1996); Lottspeich, Ang. Chem. Int. Ed. 38, 2476-2492 (1999)).

60 [0006] Otro modo de abordar el problema de analizar el contenido de proteína de tales sistemas complejos es generar una biblioteca de anticuerpos con especificidad de enlace para proteínas diferentes y determinar qué proteínas están presentes en realidad en un sistema de prueba por detección de unión al anticuerpo cognado usando un inmunoensayo adecuado. Recientemente, este método también se ha extendido para comprender el potencial de la tecnología de matrices, con anticuerpos que se inmovilizan en una superficie y la unión de antígenos

- adecuadamente marcados a éstos, que son detectados usando un sistema de formación de imágenes ópticas. La limitación de estos métodos ha sido, no obstante, que ha sido muy costoso y difícil generar una biblioteca suficientemente completa de anticuerpos con afinidad de enlace suficiente para ser útil. Por otra parte, la estabilidad limitada de los anticuerpos y su naturaleza adherente intrínseca hace prácticamente imposible desarrollar matrices fiables basadas en anticuerpos tradicionales (Borrebaeck, *Immunology Today* 21 8 (2000)).
- 5
- [0007] El abordaje tradicional del desarrollo de anticuerpos implica la inmunización de un animal con un único inmunógeno purificado y el aislamiento de las inmunoglobulinas o la clonación y la selección de secuencias de codificación de anticuerpo de este animal. Este es un proceso lento, no obstante, y depende de la identificación y la purificación en cantidad considerable de todas las proteínas individuales de interés de antemano. Por lo tanto, no se puede esperar razonable poder proporcionar una diversidad suficiente de anticuerpos. Un método alternativo cuyo uso se ha implementado recientemente implica la selección de anticuerpos capaces de unirse a por lo menos una de las proteínas de interés de una biblioteca amplia y variada de anticuerpos derivados sintéticamente o de una fuente no inmunizada.
- 10
- [0008] Otro problema significativo en el intento de correlacionar diferencias en el comportamiento y las propiedades de las células con diferencias en el contenido de proteína es que la sobrecogedora mayoría de proteínas, de hecho, no están presentes en niveles significativamente diferentes en ninguna de las dos condiciones de célula diferentes, de modo que la mayor parte de la información en, por ejemplo, un análisis de matriz de anticuerpos resulta ser irrelevante para la condición particular de interés. El riesgo es que en aquellos casos donde hay una diferencia significativa, particularmente si las proteínas implicadas no están entre las más abundantes en la célula cualquiera de los conjuntos de condiciones, pueden perderse contra los antecedentes de las señales de todas las otras proteínas irrelevantes. Un problema relacionado es que sólo 10% de las proteínas representan 90% de la masa en proteínas en células (proteínas abundantes). Si el etiquetando se realiza en extractos totales, las proteínas menos abundantes serán marcadas sólo con una eficiencia de aproximadamente 10%, lo cual hace que su detección sea casi imposible, en particular cuando están presentes proteínas abundantes marcadas.
- 15
- [0009] El potencial de perfilación de proteínas en la mejora de nuestra comprensión de la biología celular bajo diversas condiciones fisiológicas es enorme. Se anticipa que esto puede conducir a un entendimiento mucho mejor de eventos clave en el ciclo celular, el desarrollo de cánceres, enfermedades metabólicas y envejecimiento, por nombrar algunas áreas importantes de interés. A su vez, esto puede conducir a avances médico, tal como el desarrollo de fármacos nuevos. Para desarrollar este potencial, no obstante, hay una necesidad clara de métodos mejorados de control de los niveles de un gran número de proteínas bajo condiciones diferentes y, en algunas circunstancias, para métodos mejorados de enfocarse en niveles alterados de proteínas, que han demostrado correlacionarse con efectos fisiológicos pertinentes.
- 20
- [0010] WO 00/04389 (Zyomyx) divulga matrices de agentes de captura de proteína, en particular anticuerpos, para la detección simultánea de una pluralidad de proteínas que son los productos de expresión, o fragmentos de los mismos, de una célula o población de células en un organismo. Se dice que las matrices son particularmente útiles para distintas aplicaciones de proteómica incluidos modelos de evaluación de expresión de proteína y modificación en células. Según la descripción el agente de captura de proteína, o más bien el anticuerpo o fragmento de anticuerpos, se puede derivar de una variedad de fuentes, incluida la selección de una biblioteca que usa el método de exposición en fago. El anticuerpo o fragmentos de anticuerpos se pueden derivar por un método de exposición en fago que comprende la selección basada en afinidad de enlace a las proteínas (inmovilizadas) de un extracto celular o un líquido biológico. Así, algunos o muchos de los fragmentos de anticuerpos de la matriz enlazarían proteínas de identidad y/o función desconocidas. Se describe además que los genes de anticuerpos de las bibliotecas de exposición en fago puede ser de donantes inmunizados o, de forma alternativa, los anticuerpos de la biblioteca se pueden derivar de bibliotecas sintéticas o no inmunes. Las bibliotecas no inmunes fueron construidas de bazos de ratones que no han entrado en contacto con antígeno externo.
- 25
- [0011] WO 99/39210 describe matrices de alta densidad que comprenden una matriz de proteína primaria y una matriz de anticuerpo secundaria, donde la matriz secundaria comprende anticuerpos monoclonales y/o variantes de anticuerpos o derivados que enlazan específicamente o no específicamente a una o más proteínas en la matriz primaria, y donde la matriz secundaria se utiliza para determinar el perfil de proteína de una célula, tejido, órgano u organismo entero o un extracto celular, lisado o fracción de proteína derivada de los mismos.
- 30
- [0012] Haab et al.; *Genome Biology* 2(2) 4.1-4.13 (2001) describe un método para imprimir micromatrices y usar estas micromatrices en un ensayo de fluorescencia comparativa para medir el abundancia de muchas proteínas específicas en soluciones complejas. Se utilizó un dispositivo robótico para imprimir cientos de anticuerpos monoclonales derivados de los hibridomas específicos o soluciones de antígeno en una matriz en la superficie de los portaobjetos del microscopio derivatizados.
- 35
- [0013] Edwards et al., *J. Immunological Methods* 245 67-78 (2000) describen los perfiles de aislamiento y tejido de un panel grande de anticuerpos de fago que se unen a la superficie de célula de adipocito humana.
- 40
- [0014] Hoogenboom et al., *Immunotechnology*, 4 1-20 (1998) dan una revisión en exposición en fago de anticuerpos y sus aplicaciones.
- 45
- [0015] Muyldermans, *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 277-302 (2001), informan acerca del estado actual de anticuerpos de camello de dominio único.
- 50
- 55
- 60

[0016] Frenken et al., J. Biotechnology 78 11-21 (2000) informan acerca del aislamiento de fragmentos de anticuerpos VHH de llama específicos de antígeno y su secreción de alto nivel por *Saccharomyces cerevisiae*, enfocándose en particular en su afinidad de enlace a haptenos.

5 [0017] WO 00/43507 (Unilever) divulga una biblioteca de expresión que comprende un repertorio de secuencias de ácidos nucleicos clonadas de una fuente no inmunizada. Cada una codifica al menos parte de un dominio variable de una cadena pesada derivada de una inmunoglobulina naturalmente desprovista de cadenas ligeras (VHH) donde la medida de variabilidad de secuencias en dicha biblioteca se mejora por introducción de mutaciones en una o más de las regiones de determinación complementaria (CDRs) de dichas secuencias de ácidos nucleicos o generando combinaciones alternativas de CDR y secuencias de estructura no presentes naturalmente en el repertorio de
10 biblioteca no inmune.

[0018] EP-A-0584421 (Casterman et al. divulga inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, capaces de exhibir las propiedades funcionales de inmunoglobulinas convencionales (de cuatro cadenas) pero que comprenden dos cadenas de polipéptido pesadas y que además están desprovistas de cadenas polipeptídicas ligeras. Estas inmunoglobulinas (también denominadas "inmunoglobulinas de cadena pesada") que pueden ser aisladas del suero de camélidos no dependen de la asociación de dominios variable de cadena pesada y cadena ligera para la formación del sitio de unión del antígeno, sino que las cadenas pesadas de polipéptido solas naturalmente forman el sitio de unión al antígeno completo. Las mismas son así bastante diferentes de las cadenas pesadas obtenidas por la degradación de inmunoglobulinas convencionales (de cuatro cadenas) (las cuales requieren un socio de cadena ligera, formando un sitio de unión de antígeno completo para una unión óptima al antígeno).
15

[0019] WO 94/25591 (Unilever) divulga métodos para la preparación de tales anticuerpos de cadena pesada, o fragmentos de los mismos, en gran escala comprendiendo la transformación de un molde o levadura con una secuencia de ADN expresable que codifica dicho anticuerpo o fragmento.
20

[0020] EP-A-0368684 (Medical Research Council) divulga la construcción de bibliotecas de expresión que comprenden un repertorio de secuencias de ácidos nucleicos. Cada una codifica al menos parte de un dominio variable de inmunoglobulina y la selección de los dominios codificados para actividades de unión. Se afirma que los repertorios de dominios variables de inmunoglobulina que codifican genes son preferiblemente obtenidos a partir de linfocitos de animales inmunizados con un antígeno. La preparación de actividades de unión al antígeno de dominio V_H único, cuyo aislamiento se facilita por inmunización, es ejemplificada.
25

[0021] Liu and Marks, Anal. Biochem., 286 119-128 (2000)) describen un método de selección en puntos de proteína de un gel bidimensional transferido usando una biblioteca no inmune de exposición en fago F_v monocatenaria humana.
30

Resumen de la invención

[0022] El objetivo de la invención se define en las reivindicaciones. Se proporcionan matrices de proteína capaces de detectar incluso cambios menores en la expresión de proteínas en célula y extractos de tejido y con una relación señal a ruido óptima eliminando proteínas no informativas abundantes de dicha célula o extractos de tejido.
35

[0023] Este objetivo se consigue mediante una matriz de proteína, lo cual comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, caracterizado por el hecho de que dicha pluralidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos está compuesto de anticuerpos de dominio variable de cadena pesada, o fragmentos de anticuerpos, obtenibles a partir de *Camelidae*..

[0024] Preferiblemente, la matriz de proteína comprende anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de una biblioteca que comprende secuencias de ADN clonadas que codifican anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, donde los clones se derivan de un animal no inmunizado del género *Camelidae*.
40

[0025] Según otro aspecto de la descripción se proporciona un dispositivo de diagnóstico que comprende la matriz de proteína de la invención.

[0026] Se proporcionan métodos para usar tal matriz para detectar la presencia de proteínas individuales en una muestra, comparar la distribución de proteínas así revelada en diferentes tipos de célula e identificar las proteínas que pueden importantes para determinar las propiedades alteradas de células en enfermedad, envejecimiento u otras condiciones.
45

[0027] Se proporciona un método para eliminar proteínas abundantes de un extracto o muestra que no proporcionan información útil sobre la condición de una célula o tejido en dicho extracto o muestra a ser investigada, por cromatografía de afinidad usando anticuerpos de dominio variable de cadena pesada, fragmentos de anticuerpos, obtenibles de *Camelidae*.
50

[0028] Se proporciona un método de evaluación en paralelo para una pluralidad de diferentes proteínas en una muestra que son productos de expresión, o formas modificadas post-traduccionalmente de tales productos de expresión, o fragmentos de cualquiera de estos, de una célula o una población de células en un organismo, que comprende:
55

1. (a) entregar la muestra a una matriz de proteína de la invención bajo condiciones adecuadas para unión a proteínas, donde cada una de las proteínas que es evaluada es un socio de enlace es del anticuerpo o fragmento de anticuerpos de al menos un parche o agujero en la matriz; y
- 5 2. (b) detectar, ya sea directa o indirectamente, la presencia o la cantidad de proteína enlazada a cada parche o agujero de la matriz.
- [0029] Se proporciona un método para determinar el modelo de expresión de proteínas de una célula o una población de células en un organismo, que comprende:
1. (a) entregar una muestra con los productos de expresión, o formas modificadas post-traduccionalmente de tales productos, o fragmentos de cualquiera de estos, a una matriz de proteína de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la unión a proteínas; y
- 10 2. (b) detectar, ya sea directa o indirectamente, la presencia o la cantidad de proteína enlazada a cada parche o agujero de la matriz.
- [0030] Se proporciona un método de comparación de los modelos de expresión de proteína de dos células o población de células, que comprende:
- 15 1. (a) entregar una muestra con los productos de expresión, o formas modificadas post-traduccionalmente de tales productos, o fragmentos de cualquiera de estos, a una primera matriz de proteína o población de células a una primera proteína de la invención bajo condiciones adecuadas para la unión a proteínas;
2. (b) entregar una muestra con los productos de expresión, o formas modificadas post-traduccionalmente de tales productos, o fragmentos de cualquiera de estos, de una segunda célula o población de células a una segunda
- 20 matriz, donde la segunda matriz es idéntica a la primera matriz;
3. (c) detectar, ya sea directa o indirectamente, la cantidad de proteína enlazada a cada parche o agujero en la primera y la segunda matrices lavadas; y
4. (d) comparar las cantidades de proteína atada a los parches o agujeros de la primera matriz a las cantidades de proteína enlazada a los parches o agujeros correspondientes de la segunda matriz.
- 25 [0031] En otro aspecto, se proporciona un método de evaluación de una condición de enfermedad en un tejido en un organismo, que comprende:
1. (a) poner en contacto una muestra que comprende los productos de expresión, o formas modificadas post-traduccionalmente de tales productos, o fragmentos de cualquiera de estos, de las células del tejido que se están evaluando con una matriz de proteína de la invención bajo condiciones adecuadas para el enlace a proteínas, donde
- 30 los socios de enlace de una pluralidad de agentes de captura de proteína en la matriz incluyen proteínas que son productos de expresión, o formas modificadas post-traduccionalmente de tales productos, o fragmentos de cualquiera de estos, de las células del tejido y cuyos niveles de expresión son indicativos de la condición de la enfermedad; y
2. (b) detectar, directa o indirectamente, la cantidad de proteína enlazada a cada parche o agujero de la matriz.
- 35 [0032] También se describen métodos por producir las matrices de proteína.
- [0033] En otro aspecto, se promociona un método para el tratamiento simultáneo de antígenos objetivo y la evaluación de las condiciones de selección, también denominado la estrategia de "micro-panning", que comprende el uso de la combinación de panning en una placa de microtitulación y el valor predictivo de fago ELISA, realizados simultáneamente
- 40 [0034] Estos y otros aspectos será explicados en la siguiente descripción detallada, figuras y ejemplos.
- Breve descripción de los dibujos
- [0035]
- La Fig. 1 es un esquema de varios métodos sobre cómo seleccionar bibliotecas de sustracción de anticuerpos según la invención y cómo etiquetar solamente las proteínas interesantes (baja abundancia) para su detección.
- 45 La Fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de VHH de reactividad cruzada de Ig de ratón.
- La Fig. 3 muestra las secuencias de aminoácidos de VHH específicos de la subclase de IgG.
- La Fig. 4 muestra VHH manchado en portaobjetos de vidrio revestido con polilisina e incubado con IgG de ratón total marcado con Cy3 . 1) VHH B5; 2) VHH C4; 3) VHH E7; 4) VHH H2; 5) VHH anti-GST; 6) PBS.
- Definiciones
- 50 [0036] Según se utiliza en este caso, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina que puede derivar de fuentes naturales o sintéticamente producidas en parte. Una "biblioteca", en el contexto de la invención, es una biblioteca de anticuerpos. Cada una es codificada por una secuencia de ácidos nucleicos única clonada. El término

"biblioteca no inmune", según se utiliza en este caso, indica una biblioteca obtenida de fuentes bien conocidas de anticuerpos de codificación de ARNm de animales que no han sido inmunizados. Una "biblioteca inmune" es una biblioteca según esta definición, donde las secuencias se clonan a partir de un animal que ha sido inmunizado previamente con una preparación que comprende una o más proteínas. Un "biblioteca de anticuerpos de sustracción", según se utiliza en este caso, es una colección de anticuerpos en la que cada anticuerpo es capaz de enlace específico a una proteína que está presente en una célula o tipo de tejido elegido, pero no a la proteína presente en la célula o tipo de tejido de referencia (es decir, células idénticas originalmente pero diferentes fenotípicamente; por ejemplo células vieja contra joven).

Descripción detallada de la invención

[0037] Es un hallazgo inesperado que las matrices de anticuerpos basadas en anticuerpos de dominio variable de cadena pesada seleccionados obtenibles de *Camelidae*, también denominados anticuerpos de dominio simple o VHHs, sean altamente específicas. (Por "seleccionados" se entiende bajo condiciones similares a las que se utilizarán más adelante en la matriz, por ejemplo, sal alta y/o temperatura alta). Este hace posible o facilita la clonación de dominios variables del anticuerpo y la expresión recombinante posterior y proteínas cognadas de selección, por ejemplo, por expresión del anticuerpo en la superficie de fagos o eucariotas inferiores.

[0038] Los anticuerpos de dominio simple pueden ser funcionalizados fácilmente en su C-terminal sin perjudicar su funcionalidad, estabilidad de productividad. El hecho de que sólo se seleccionan los VHH que son funcionales bajo las condiciones rigurosas usadas durante la selección mejora la relación señal a ruido significativamente.

[0039] Un segundo elemento es que con VHH es relativamente simple construir bibliotecas de sustracción para las matrices. El uso de estas bibliotecas de sustracción en general mejora la resolución/sensibilidad con un factor 10 aproximadamente.

[0040] Un tercer elemento es que las proteínas a ser cuantificadas son marcados sólo después de la eliminación de proteínas no informativas. Este método mejora la resolución/sensibilidad con un factor de aproximadamente 10.

[0041] La excelente calidad y diversidad de una biblioteca no inmune de anticuerpos de dominio de cadenas simples de *Camelidae*, que es la fuente preferida de hacer las matrices de proteína según la presente invención, se muestra en el ejemplo 9 más abajo. A diferencia del estado de la técnica, la biblioteca no inmune de anticuerpos de dominio de cadena simple de *Camelidae* reconoció más del 95% de una amplia gama de antígenos. Sólo debido a su diversidad extrema, los presentes inventores pudieron desarrollar una matriz de proteína

que reconoció casi todas las proteínas humanas y sus modificaciones postraduccionales.

[0042] Una ventaja adicional de realizar la matriz a temperatura elevada (>45 °C) y/o sal alta (> 1 mol) y/o en presencia de tensioactivos es que las interacciones de proteína que frecuentemente ocurren en matrices celulares y extracelulares son descompuestas de modo que de hecho se miden proteínas individuales y no, como es frecuentemente el caso en otras matrices de proteína, complejos de proteínas no determinados.

[0043] Se proporcionan diferentes formas de eliminar las proteínas abundantes no informativas de los extractos y obtener VHH que son pertinentes al extracto de célula, suero o tejido a ser investigado. Los distintos abordajes sobre cómo seleccionar bibliotecas de sustracción de anticuerpos y marcar sólo las proteínas de baja abundancia interesantes para su detección se resumen en la figura 1.

[0044] En un método preferido, se utiliza una columna con VHH enlazado covalentemente que reconoce las proteínas altamente abundantes. Estas proteínas abundantes están unidas a esta columna de afinidad. Ejemplos típicos de proteínas abundantes que han sido quitadas de esta manera se dan en la tabla 1 más abajo. Los antígenos restantes son luego enlazados preferiblemente a VHH de una biblioteca no inmune de VHH con propiedades particulares, como se ha descrito en la presente. De esta biblioteca no inmune, los VHH que reconocen proteínas abundantes son quitados, creando así una biblioteca como la que se indica en la Fig 1/a1 ("sub N. libr.").

Tabla 1

Proteínas abundantes, diferentes isoformas de:	
Colágenos	Tubulina
Fibronectina	Espectrina
Laminina	Filamento int.
Elastina	Histonas
Actina	Proteínas ribosómicas
Miosina	

[0045] En un paso posterior (Fig 1/a2) los VHH de la misma biblioteca no inmune se seleccionan para enlazar a proteínas de baja abundancia bajo condiciones comparables a aquellas usadas durante el ensayo de matriz de proteína. Esto significa que las condiciones bajo las cuales el enlace específico de antígenos para sostener el material y el enlace de antígenos no específicamente a anticuerpos (o "no cognado") son mínimas. Los últimos dos pasos se consiguen por bloqueo específico de material de soporte y condiciones de enlace que normalmente son consideradas condiciones estrictas, tal como enlace en presencia de alta concentración de sal y/o tensioactivo y temperatura relativamente alta. Los VHH que se usan para la matriz de proteína son elementos de la biblioteca designada como en la Fig 1.

[0046] Uno de los métodos para detectar diferencias entre la célula de tipo A y la célula de tipo B, o el tejido de tipo C y el tejido de tipo D (no ilustrado en la Figura 1), puede, por ejemplo, optimizarse de la siguiente manera (véase el paso a3 en la Figura 1):

1. 1°. Extracción de proteínas abundantes tanto de las células de tipo A como las de tipo B (o tejidos de tipo C y D, respectivamente) de un extracto de proteína, primero por tratamiento químico y/o físico, por ejemplo, centrifugado seguido de cromatografía en columna usando una columna de anticuerpos inmovilizados de *Camelidae* contra estas proteínas abundantes, y/o usando una temperatura elevada en el intervalo de aproximadamente 20-90°C, preferiblemente de 30-70 °C, de forma más preferible de 45-65 °C, donde el extracto de proteína contiene preferiblemente una concentración de sal de aproximadamente 1-4 mol, por ejemplo de NaCl, más preferiblemente 1,3-3 mol de NaCl, y opcionalmente un no iónico o aniónico; y

2. 2°. Etiquetando de las proteínas restantes de célula tipo A (o tejido de tipo C) con un primer marcador P y de célula de tipo B (o tejido de tipo D) con un segundo marcador Q, respectivamente, y determinando la proporción de P:Q en la matriz utilizando el reconocimiento del VHH de las proteínas de baja abundancia.

[0047] Será evidente que los VHH seleccionados para enlazar proteínas abundantes se pueden usar para el desarrollo de una matriz. Tal matriz se utiliza para determinar la cantidad de estas proteínas directamente después de que el extracto total es marcado. El hecho de que están presentes proteínas de baja abundancia no plantea un problema, ni para el etiquetado ni para la selección y detección.

[0048] Otro método es empezar con una biblioteca inmune contra una célula o extracto de tejido determinado. A partir de estos extractos, las proteínas abundantes no informativas son quitadas, creando así la biblioteca designada como en la Fig 1. Una matriz de proteína está hecha de VHH (de la biblioteca designada como en la figura 1) que reconocen proteínas de baja abundancia de relevancia de la célula o extracto de tejido a ser evaluado. La detección de proteínas pertinentes de este extracto de célula, suero o tejido está hecha en un modo similar al descrito en el párrafo precedente en matrices que se originan de bibliotecas no inmunes. Además, en este método se desarrolla una matriz que es capaz de detectar las proteínas abundantes en el extracto A.

[0049] Un tercer método es elevar un banco inmune contra extractos de la célula A (o tejido C), selección del los VHH de este banco inmune que enlazan con las proteínas presentes en este extracto y eliminación posterior de los VHH que enlazan a proteínas de una célula de referencia B (o tejido D), creando así una biblioteca de sustracción que sólo contiene proteínas de reconocimiento de VHH que son únicas para la célula A (o tejido C). Véase la Figura 1/c1. Esta biblioteca se designa SI(A-B)L.

[0050] De forma similar, se crea un banco SI (B-A) L con VHH que esté reconociendo proteínas que son únicas para la célula B o el tejido B. De estas bibliotecas se pueden hacer matrices como se describe anteriormente y se realiza el etiquetado de las proteínas en el extracto A después de la eliminación de las proteínas también presentes en B, mientras que el etiquetado de las proteínas del extracto B se hace después de la eliminación de las proteínas también presentes en A.

[0051] El tipo de anticuerpo para el uso en la invención es un dominio variable de cadena pesada derivado de una inmunoglobulina que naturalmente está desprovista de cadenas ligeras (dominio de VHH), tal como aquellos que se pueden obtener de camélidos, donde el sitio de unión con el está contenido exclusivamente en el dominio variable de cadena pesada. Las ventajas del uso de este tipo de dominio de anticuerpos son, primero, que la falta de un dominio variable de cadena ligera significa que la dimensión extra de variabilidad en el repertorio de anticuerpos que resultan de la posibilidad de aparear diferentes combinaciones de dominios variables no está presente, de modo que, durante el paso de clonación en la preparación de una biblioteca de anticuerpos, se evita la generación de un gran número de anticuerpos irrelevantes por discrepancias de dominios variables de cadena ligera y pesada. En consecuencia, mientras se mantiene la biblioteca en un tamaño viable, es posible obtener una biblioteca completa inmune o no inmune (es decir, donde hay al menos un anticuerpo reconociendo cualquier proteína) y eliminar anticuerpos irrelevantes de la misma. Una segunda ventaja es que se ha demostrado que los dominios de VHH son significativamente más estables que los anticuerpos tradicionales, de modo que se espera que los dispositivos de matriz basados en éstos sean significativamente más robustos (Van der Linden et al, BBA 1431, 37-46 (1999)).

[0052] Según otro aspecto, se proporcionan métodos para generar una biblioteca de anticuerpos con especificidad para cualquier proteína pertinente en una mezcla compleja de una biblioteca no inmune o una biblioteca sintética (en la cual las regiones de una secuencia de ácidos nucleicos clonada que codifica un anticuerpo que corresponde a bucles de determinación de complementariedad se sustituyen con secuencias aleatorias o parcialmente aleatorias). Estos tipos de bibliotecas proporcionan recursos en los cuales los anticuerpos capaces de unión a un antígeno particular puede aparecer puramente por casualidad, y donde estos anticuerpos puede ser seleccionados. Las

proteínas varían mucho en abundancia y en inmunogenicidad y es posible que los anticuerpos contra algunas de ellas, sobre todo "autoantígenos", por ejemplo, no sean representados en una biblioteca inmune. Otra ventaja de la biblioteca no inmune usada para el desarrollo de la matriz es que, debido a su tamaño y enorme diversidad, contiene anticuerpos que reconocen proteínas modificadas posttraduccionalmente, incluso si estas modificaciones son pequeñas. Es bien sabido que la generación de anticuerpos contra proteínas modificadas posttraduccionalmente es problemática puesto que estos antígenos frecuentemente son inestables en el suero de animales y, por lo tanto, se descomponen antes de que el sistema inmune comience a desarrollar los anticuerpos cognados. Usando diversas fuentes de proteínas abundantes de matriz extracelular y celular para seleccionar fagos o eucariotas inferiores que lleven en su superficie VHH, es relativamente fácil eliminar de la biblioteca no inmune los anticuerpos que reconocen proteínas abundantes, creando así una biblioteca no inmune (de sustracción) para las proteínas de baja abundancia.

[0053] Un método alternativo para generar una biblioteca de anticuerpos con especificidad para cualquier proteína en una mezcla compleja es seleccionar los anticuerpos de una biblioteca inmune.

[0054] Para obtener estos anticuerpos con afinidad razonablemente alta para su antígenos de proteína cognada, es conveniente clonar secuencias que los codifiquen de un animal que haya sido inmunizado previamente contra una preparación que comprenda todas las proteínas presentes en el tipo de célula de referencia elegida, o compartimiento de la misma. Este permite el proceso natural de "maduración" *in vivo* que conduce a la proliferación de células que producen tales anticuerpos de alta afinidad contra este inmunógeno de proteína compleja. Una biblioteca de secuencias de anticuerpos clonada de tal fuente inmunizada contiene así una proporción sustancial de secuencias que codifican anticuerpos con una alta afinidad para las proteínas de interés. Este abordaje difiere radicalmente del abordaje tradicional del desarrollo de anticuerpos antiproteínicos, por el cual un animal es inmunizado con una única proteína purificada o casi purificada.

[0055] Habiendo suscitado una respuesta inmunitaria contra el conjunto completo de proteínas del tipo de célula de referencia, o compartimiento de célula, el conjunto completo de genes que codifican los anticuerpos de cadena pesada o, más preferiblemente, los fragmentos de gen que codifican los dominios variables de los mismos, es clonado. La metodología apropiada para este paso es bien conocida. Adecuadamente, una genoteca de ADNc, que comprende un repertorio de secuencias de ácidos nucleicos las cuales codifican cada una un dominio variable de cadena pesada, se genera por clonación de ADNc derivado de ARNm de células linfoides del animal inmunizado en un vector de expresión adecuado. Además, las secuencias de ácidos nucleicos se pueden derivar de ADN genómico, adecuadamente derivadas de células B reordenadas.

[0056] Para facilitar los pasos de selección descritos más abajo, el vector en el que se clona la genoteca de ADNc dirige la expresión de los genes de anticuerpos, en un huésped adecuado, mientras se fusiona con una proteína prevista para la localización en la superficie de la célula huésped o, en el caso de un vector vírico, en la superficie de la partícula de virus, de manera que el dominio de enlace de anticuerpos estará expuesto y será capaz de enlazar al antígeno. Por consiguiente, la célula huésped o partícula de virus se denomina en este caso el vehículo de expresión de anticuerpos. Los sistemas de expresión adecuados son sabidos por los expertos en la técnica.

[0057] Preferiblemente, el vector dispone de una secuencia que codifica una extensión peptídica, por ejemplo ,GST y/o una etiqueta His o Myc, que será anexada a los anticuerpos expresados en sus C-terminales nor. Dicha extensión peptídica puede, por ejemplo, permitir al anticuerpo, expresado en la superficie del vehículo, enlazar a otro anticuerpo que específicamente reconozca la extensión peptídica, y esto puede, a su vez, facilitar el aislamiento (si el segundo anticuerpo es inmovilizado) o la detección (si el segundo dispone de una marca adecuada) de vehículos de expresión de anticuerpos. Una extensión peptídica también puede utilizarse para mediar la inmovilización del anticuerpo en el material de soporte de una matriz. La introducción de GST u otra proteína nos proporciona una metodología para medir y estandarizar la cantidad de anticuerpo presente a cada punto en la matriz.

[0058] En una forma de realización preferida, el vehículo de expresión de anticuerpos es un bacteriófago filamentoso, particularmente, M13 o un derivado. La técnica de "expresión en la superficie de un fago" usando un vehículo de este tipo está bien documentada. En otra forma de realización preferida, el vehículo de expresión de anticuerpos es una célula eucariótica inferior más particularmente, una célula de levadura. Nuevamente,

la "expresión en levadura" es ahora un método bien establecido.

[0059] Ha varios métodos disponibles para seleccionar de una biblioteca como se ha descrito anteriormente sólo aquellos anticuerpos que son capaces de unión a por lo menos una proteína en el tipo de célula de referencia, o compartimiento de de la misma. La aplicabilidad de un método dado depende de si el vehículo de expresión de anticuerpos que se debe emplear es una célula bacteriófaga o una eucariótica, y si el conjunto de referencia de proteínas son solubles en solución acuosa (por ejemplo, proteínas citosólicas o solubles de uno o más tipos de orgánulo celular tal como, por ejemplo, núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico, peroxisomas, vacuola) o se asocian con una membrana, por ejemplo la membrana plasmática, del tipo de célula elegida.

[0060] Según una forma de realización, donde el vehículo de expresión de anticuerpos es un bacteriófago y el conjunto de referencia de proteínas son proteínas solubles, una preparación de dichas proteínas se inmoviliza en una superficie sólida, de modo que posteriormente los anticuerpos de expresión de vehículos capaces de enlace a éstas puedan capturararse en dicha superficie, permitiéndoles así ser separadas de vehículos que expresen anticuerpos irrelevantes, que pueden ser eliminados por lavado. Alternativamente, complejos de vehículos específicos de expresión de anticuerpos con sus antígenos de proteína cognadas se pueden formar en solución y

ser capturados posteriormente en una superficie. Para los objetivos de cualquiera de estos métodos, la captura en la superficie se consigue convenientemente mediante biotilación de las proteínas en la preparación, de modo que luego puedan ser enlazadas a una superficie derivatizada con estreptavidina. El bacteriófago seleccionado de esta manera puede entonces utilizarse para infectar una cepa huésped de *E. coli* adecuada, para rescate en fago. Aunque se diseñó principalmente con el bacteriófago en mente, estos métodos también podrían ser aplicados donde se expresan los anticuerpos en una superficie de célula eucariótica.

[0061] Un método de selección alternativo aplicable donde el conjunto de referencia de proteínas son proteínas solubles, y donde el vehículo para expresión de anticuerpos es una célula eucariótica, tal como una célula de levadura, implica la colocación de dichas células de expresión de anticuerpos en contacto con una solución con la mezcla de referencia elegida de proteínas. Dichas proteínas deben haber sido marcadas previamente con una marca detectable. Aquellas células que expresan un anticuerpo que reconoce al menos una proteína en el conjunto de referencia son identificables en consecuencia mediante las proteínas marcadas adheridas a ellas, permitiéndoles ser aisladas mediante un clasificador de célula adecuado. Las células seleccionadas de esta manera pueden entonces ser amplificadas por cultivo. Convenientemente, la marca es un grupo fluorescente y las células se aíslan mediante un clasificador de célula activado por fluorescencia.

[0062] Una estrategia de selección diferente que se puede adoptar en particular donde las proteínas de referencia se asocian con uno de los muchos sistemas de membrana en y sobre la célula implica la captura en dicha superficie de anticuerpos de expresión de vehículos con especificidad de enlace para al menos una proteína localizada a dicha superficie de célula. Las células luego son aisladas, llevando sus vehículos de expresión de anticuerpos capturados con ellas, mientras se dejan detrás los vehículos irrelevantes. En el caso en que el vehículo de expresión de anticuerpos es un bacteriófago (y, por lo tanto, demasiado pequeño para ser centrifugado por centrifugado de velocidad baja) las células normalmente se aíslan convenientemente simplemente mediante centrifugación. Los fagos centrifugados con ellas entonces pueden utilizarse para infectar una cepa huésped de *E. coli* adecuada para rescate en fago.

[0063] En los casos en que el vehículo para expresión de anticuerpos es una célula eucariótica, se puede emplear una estrategia de selección alternativa para el caso en el que el compartimiento de célula de referencia comprende la membrana del tipo de célula de referencia elegida, donde las células de expresión de anticuerpos están marcadas con una marca detectable, puestas luego en contacto con las células portadoras de proteína de antígenos de referencia. Entonces, pueden seleccionarse células portadoras de antígenos de referencia a las cuales se adhieren las células de expresión de anticuerpos puede, basándose en la presencia de la marca y el tamaño aumentado del total en comparación con una célula de expresión de anticuerpos libre, usando un clasificador de célula adecuado. De forma alternativa, las células doblemente marcadas podrían aplicarse. De manera adecuada, la marca será un grupo fluorescente que se puede unir a una molécula en la superficie de la célula de expresión de anticuerpos o incorporarse internamente en la célula. Esto permitiría el uso de la clasificación de células activada por fluorescencia, en combinación con selección de tamaño, para aislar células de expresión de anticuerpos que se enlazan a células portadoras de antígeno de referencia. Las células de expresión de anticuerpo así seleccionadas pueden entonces ser amplificadas por cultivo.

[0064] En una variante del método, los anticuerpos son adecuadamente seleccionados basándose en su capacidad para cualquier matriz de proteínas obtenido por un proceso que implica la clonación de secuencias de ADN que codifican genes estructurales de un organismo elegido, extendiendo estas secuencias con una secuencia de nucleótidos que codifica glutatión-S-transferasa (GST) o una marca His6, expresando de los genes extendidos en un huésped adecuado o por producción en sistemas de traducción libres de células, y depurando las proteínas de fusión resultantes. Este paso de purificación es facilitado considerablemente por provisión de extensión de GST o His6. Aunque la función de las proteínas codificadas por los genes clonados y expresados de esta manera no es siempre conocida, se caracteriza por una única secuencia de aminoácidos. Estas proteínas con una extensión de GST o His6 son óptimamente adecuadas para seleccionar anticuerpos específicos de una biblioteca de fago con métodos similar a aquellos desarrollados para la selección de proteína de alto rendimiento. Se pueden usar otras proteínas o péptidos en lugar de GST o His6, con la condición de que proporcionen la posibilidad de purificación por afinidad relativamente superficial.

[0065] También se describe un método de selección de alto rendimiento con aquellos productos genéticos purificados marcados, llamado "micropanning", que permite el tratamiento simultáneo de grandes números de antígenos objetivo en un modo controlado con bio medición "en línea" del éxito o el fracaso de la selección con un fago ELISA. La selección en formato de placa de microtitulación permite la automatización completa de la tecnología sobre la base de las decisiones tomadas por ordenador usando la lectura de ELISA.

[0066] En comparación con métodos de selección habitualmente usados basados en los pasos de selección (es decir, con antígeno inmovilizado), la técnica de "micro-panning" según se describe en la presente habilita el tratamiento simultáneo de grandes números de antígenos objetivo en un modo controlado al igual que la evaluación de muchas "condiciones de aplicación" que se pueden evaluar para las selecciones. El formato de placa de microtitulación permite que se evalúen más condiciones sin aumentar el esfuerzo. El fago ELISA incorporado genera información "en línea" sobre el éxito o el fracaso de una determinada condición de panning. Esta característica combinada con el formato de placa de microtitulación permite la completa automatización de la tecnología, según

decisiones tomadas por el ordenador sobre los valores del fago ELISA para la continuación de un número limitado de selecciones.

[0067] Generalmente, los antígenos se revisten en inmunotubos (4 ml) y son incubados con una determinada entrada de partículas de fago.

5 Después de la incubación y el lavado, los fagos enlazados son eluidos y amplificados después de la infección de células de *E. coli*, sirviendo así como fagos de entrada para una nueva ronda de panning. Sólo durante la siguiente
 10 ronda de panning, se pueden evaluar los fagos de entrada en un fago ELISA para determinar el enriquecimiento de fagos de anticuerpo específicos de antígeno en comparación con los no específicos (anteriores), lo cual indica si la ronda anterior de selección fue exitosa. En la siguiente ronda de panning, nuevamente se usa una concentración
 15 de fagos de entrada pero ahora la concentración de antígeno usada para el recubrimiento es bajada y/o varían las condiciones de enlace dependiendo de la aplicación final. Los fagos recuperados de esta ronda se producen para servir como fagos de entrada para una tercera ronda de panning, etcétera.

[0068] Siguiendo esta estrategia, el éxito de una selección sólo puede medirse en la siguiente ronda de panning cuando se han producido nuevos fagos de entrada y se evalúan en un fago ELISA. No obstante, por cuestiones
 15 prácticas y para evitar la pérdida de tiempo, la siguiente ronda de panning es iniciada frecuentemente sin este control del enriquecimiento específico del antígeno. La enriquecimiento medido normalmente sólo se basa en la comparación del número de fago eluido de los inmunotubos revestidos con antígeno contra los no revestidos. Con el método de selección presente, un fago ELISA realizado con el fago de entrada en pocillos revestidos con antígeno y no revestidos indica inmediatamente qué selecciones son exitosas y deben ser continuadas, al tiempo que pueden
 20 omitirse experimentos de panning menos prometedores.

[0069] La estrategia de "micro-panning" nueva según se describe en la presente se basa en la combinación de panning en un formato de placa de microtitulación y el valor predictivo de un fago ELISA, realizada simultáneamente. Por esta disposición única, el enriquecimiento específico de antígenos después de cada ronda de selección puede medirse directamente, permitiendo así una elección bien fundada de fagos de entrada para los siguientes ciclos de
 25 panning, al tiempo que pueden omitirse experimentos que produzcan fagos no enriquecidos.

[0070] Otra ventaja importante es que, debido al hecho de que muchas condiciones diferentes pueden ser evaluadas, se pueden usar cantidades variables de fagos de entrada simultáneamente para reducir el enriquecimiento de anticuerpos de fago pegajosos. Por dilución de fago de entrada, los anticuerpos de fago de afinidad alta pueden competir más eficazmente con anticuerpos de fago no específicos o de baja afinidad. Por lo tanto, el número de anticuerpos de fago enlazados de baja afinidad o no específicos caerán relativamente más rápido que el número de los anticuerpos de alta afinidad cuando se utilizan números inferiores de fago de entrada. Así, en comparación con métodos de selección actuales, el micro-panning no es sólo una cuestión de reducción, sino que la diferencia clave en el principio de trabajo es que el micro-panning es impulsado por reducción del número de anticuerpos de fago no específicos, mientras que los métodos de panning actuales se concentran en
 30 aumentar el número de los específicos. Aunque el objetivo final es el mismo, el método de selección tradicional es más susceptible a anticuerpos de fago "pegajosos" que puede aumentar durante el panning y así totalmente eliminar los específicos, especialmente cuando se usa a títulos altos.

[0071] Por lo tanto, el micro-panning es una herramienta eficaz para seleccionar bibliotecas no inmunes, inmunológicas y sintéticas en gran número de moléculas objetivo diferentes, permitiendo así la generación de grandes paneles de anticuerpos en marcos temporales más bien breves necesarios para la generación de matrices (proteómicas). El formato del método permite la automatización para el panning de rendimiento alto sin la necesidad de robótica sofisticada.

[0072] Después de la selección de anticuerpos por cualquiera de los métodos anteriores, el siguiente paso en el aislamiento de genes individuales que codifican fragmentos que son capaces de unión a proteínas en las células de referencia es, preferiblemente, para confirmar el enlace mediante un ELISA u otro inmunoensayo. En el caso en el que las proteínas de referencia son solubles, un ELISA, por ejemplo, se puede realizar inmovilizando los anticuerpos en las paredes de una placa de microtitulación e incubándolos con una muestra de la mezcla de proteína de referencia, donde dichas proteínas han sido marcadas previamente con una marca adecuada. Después de dejar que pase tiempo para que se produzca la unión, y de eliminar por lavado las proteínas no unidas, se agrega una enzima, que tiene una segunda marca que específicamente se enlaza a la primera de modo que, siempre que la unión sea cuantitativa, una molécula enzimática se une a la superficie para cada molécula de proteína de antígeno enlazada allí por un anticuerpo cognado. La cantidad de enzima enlazada entonces puede determinarse midiendo su actividad catalizando una convenientemente seguida. Convenientemente, las proteínas de referencia se marcan con biotina y la enzima con estreptavidina. La enzima puede, por ejemplo, ser peroxidasa de rábano.

[0073] En el caso en los que las proteínas de referencia se localizan en la superficie del tipo de célula elegida, es apropiado un método diferente para confirmación de enlace. Por ejemplo, una muestra de las células portadoras de antígeno de referencia se añade a un vaso adecuado, tal como una placa de microtitulación con pocillos con forma de "V". Luego se agregan anticuerpos libres al vaso y, tras la incubación, las células son centrifugadas y se extrae el material no unido. Después de la repetición del proceso para asegurar la eliminación completa del material no unido, se detecta la presencia de anticuerpos que se han unido a las células objetivo. Este puede realizarse de varias maneras, que se sugerirán fácilmente a los expertos en la técnica. Por ejemplo, si los anticuerpos se expresan con
 60

una extensión peptídica ("TAG"), se pueden detectar por un ELISA usando un anticuerpo anti-TAG biotinilado y una enzima de estreptavidina conjugada.

[0074] Es preferible, para muchas aplicaciones de una biblioteca de anticuerpos construidas como se describe en este caso, identificar las proteínas específicas a las que anticuerpos seleccionados individuales son capaces de unirse o, donde dichas proteínas no son ya conocidas, caracterizarlas todo lo posible. Este puede abordarse de varias formas. Por ejemplo, técnicas estándar tal como transferencia Western bidimensional, seguida de secuenciación de proteína N-terminal, o se puede aplicar selección de dos híbridos. Una estrategia alternativa, en el caso donde el vehículo de expresión de anticuerpos es una célula eucariótica, es cultivar dichas células y luego incubarlas con un exceso de proteínas de las células de referencia, o compartimiento de las mismas, siendo dichas proteínas preferiblemente marcadas con una marca detectable. Esta mezcla es luego centrifugada y lavada para eliminar proteínas no unidas, antes de recolector las células con las moléculas de proteína enlazadas a los anticuerpos expresados en su superficie. Preferiblemente, las células se seleccionan para ser recogidas basándose que porten la marca detectable. La proteína enlazada luego es separada y purificada por métodos bioquímicos estándares. Entonces puede ser caracterizada por métodos químicos de proteína conocida; en particular, se puede determinar su secuencia N-terminal. Esto puede compararse con bases de datos de secuencia para tratar de identificar la proteína, al menos de manera tentativa. Esto también puede utilizarse para diseñar sondas de oligonucleótidos o cebadores adecuados para el uso en clonación del gen o ADNc que codifica la proteína, de modo que pueda determinarse su secuencia completa.

[0075] Los métodos basados en métodos de sustracción son especialmente adecuados en los casos en los que los vehículos de expresión de anticuerpos son bacteriófagos y los antígenos de proteína son solubles; en este caso, los fagos seleccionados pueden utilizarse para infectar una cepa huésped de *E. coli*, para rescate de fago. Un método similar puede también, en principio, ser aplicado en casos en los que los vehículos de expresión de antígenos son células eucarióticas

[0076] En otra forma de realización aplicable especialmente en casos en los que el vehículo de expresión de anticuerpo es una célula eucariótica y los antígenos de proteína son solubles, las proteínas desde el primer y segundo tipo de célula son marcados de manera separada con una marca detectable tal como un fluoróforo. Los vehículos de expresión de anticuerpo de la biblioteca progenitora se incuban con las proteínas marcadas de el segundo tipo de célula y los vehículos a lo que cualquier proteína se enlaza se identifican por la presencia de la marca y son quitados, usando un clasificador de célula adecuado. Los vehículos restantes son ahora incubados con las proteínas marcadas desde el primer tipo de célula, y vehículos a lo que cualquier proteína se enlaza se identifican por la presencia de la marca y son recogidos, mientras que las células no marcadas son descartadas, usando un clasificador de célula adecuado. En los casos en los que la marca es fluorescente, un clasificador de célula activado por fluorescencia es conveniente para este propósito. Las células recogidas comprenden una biblioteca donde los anticuerpos son específicos para las proteínas presentes en el primero pero no el segundo tipo de célula; las células seleccionadas individuales entonces pueden ser amplificadas por cultivo.

[0077] En una variante de este método, aplicable en los casos en los que los vehículos de expresión de anticuerpos son células eucarióticas y el conjunto elegido de antígenos de proteína en el primer y el segundo tipos de célula se localizan en la membrana plasmática, los vehículos de expresión de anticuerpo se incuban con un exceso de células portadoras de antígeno del segundo tipo, marcadas con una marca detectable. El marcador, que puede adecuadamente ser un fluoróforo, se puede unir a moléculas a la superficie de las células, o puede ser incorporado internamente. Luego se realiza la clasificación de células, de modo que cualquier célula o agregado de célula que lleve el marcador es descartado, seleccionando así los vehículos no capaces de enlace a ninguna proteína en la superficie del segundo tipo de célula siendo así seleccionado. Estos vehículos recogidos se amplifican por cultivo y luego son incubados con células portadoras de antígeno del primer tipo elegido. Dichas células son marcadas con una marca detectable. Los agregados de célula que comprenden tanto vehículos de expresión de anticuerpo como células portadoras de antígeno luego son seleccionadas, basándose en la presencia sobre las mismas de la marca detectable (usando un clasificador de célula activado por fluorescencia, donde dicha marca es fluorescente) y de sus tamaño superior que el de las células portadoras de antígeno carentes de vehículos de enlace. Como una alternativa a este último paso de separación basándose en el tamaño de enlace de células portadoras de antígenos libres, es posible proporcionar los vehículos de expresión de anticuerpos con una etiqueta, detectable y diferente independientemente de la que llevan las células portadoras de antígeno, y luego seleccionar sólo agregados de células que lleven ambos tipos de marcador.

[0078] Una biblioteca complementaria, caracterizada por el hecho de que cada anticuerpo es capaz de unión a una proteína que está presente en el segundo tipo de célula elegida, o compartimiento del mismo, pero que está ausente en el primer tipo de célula, o compartimiento del mismo, se genera por aplicación de cualquiera de los métodos anteriores, que difiere sólo en que la función del primer y segundo tipos de célula, o las proteínas de los mismos, son inversos.

[0079] Después de la selección de anticuerpos por cualquiera de los métodos anteriores, el siguiente paso en el aislamiento de genes individuales que codifican fragmentos de anticuerpo que son capaces de unión a proteínas de un primer pero no un segundo tipo de célula es, preferiblemente, confirmar la selectividad y la afinidad de unión mediante ELISA u otros inmunoensayos. Estos métodos de inmunoensayo dependen de la capacidad para producir el anticuerpo clonado en forma soluble y para inmovilizarlo en una superficie adecuada. Estos pasos, al igual que los

ensayos mismos se pueden realizar en las mismas maneras que se han descrito anteriormente para el caso de una biblioteca de anticuerpo completa. Los anticuerpos que satisfacen los criterios de selección deberían demostrar afinidad razonable para una proteína entre aquellas del primer tipo de célula, pero no para cualquier proteína del segundo tipo de célula.

5 [0080] Una biblioteca de anticuerpos de sustracción es particularmente valiosa para suministrar anticuerpos capaces de unión a proteínas que están presentes en cantidades que difiere en células de diferentes tipos, y que por lo tanto permiten la identificación y caracterización las mismas. En particular, en los casos en los que la biblioteca está completa, en el sentido de que comprende anticuerpos específicos para todas las proteínas presentes en una cantidad significativamente superior en el primer tipo de célula, o el compartimiento elegido de la misma, y donde esta biblioteca es complementada por una segunda en la que hay anticuerpos capaces de unión a cada proteína que está presente en una medida significativamente superior en el segundo tipo de célula, o compartimiento de la misma. Esto proporciona un medios muy potentes de identificar las diferencias metabólica claves que subyacen propiedades diferentes de los dos tipos de célula. Este método es aplicable a una amplia variedad de pares de tipos de célula, de las cuales unas pocas incluyen células de especies distintas pero relacionadas, células de células alternativamente diferenciadas del interior de un organismo, células nominalmente equivalentes de organismos que muestran diferencias genéticas o de desarrollo, o células normales en comparación con otras afectadas por enfermedad, envejecimiento o fármacos.

[0081] El aislamiento de las proteínas específicas a las que se enlazan anticuerpos seleccionados individuales, para caracterizar y, donde sea posible, identificarlas puede abordarse de distintas formas, tales como las descritas más arriba para el caso de la biblioteca de anticuerpos completa. Una vez que se ha identificado un conjunto de proteínas que están presentes en cantidades significativas en los tipos de célula alternativos, una posibilidad es usar la presencia o aprovechar la actividad de uno o más de estos para objetivos de diagnóstico en, por ejemplo, la identificación de la presencia de enfermedad. De hecho, puede ser conveniente usar el anticuerpo, de la biblioteca de anticuerpos de sustracción, al cual dicha proteína se enlaza como la base para un inmunoensayo.

25 [0082] También es posible investigar el posible papel de proteínas individuales, identificadas a través de su unión a anticuerpos en una biblioteca adecuada de sustracción, la propiciación de las diferencias metabólicas observadas entre dos tipos de célula. En los casos en los que sea conveniente invertir o mejorar dichas diferencias, por ejemplo, en el caso en el que uno de los tipos de célula está en un estado de enfermedad, esto proporciona un modo de identificar posibles moléculas objetivo, por ejemplo, para terapia con medicamento. Esto puede abordarse, por ejemplo, por supresión de expresión del gen que codifica la proteína, en células donde de otra manera estaría presente, o transformación de células en las que de otra manera estaría ausente con un constructo con el gen y un promotor para dirigir su expresión. De manera alternativa, un modo conveniente de suprimir la actividad de la proteína en cuestión es generar una célula transgénica en la cual se expresa el gen que codifica un anticuerpo de la biblioteca de sustracción, siendo dicho anticuerpo capaz de unión a la proteína en cuestión, y el anticuerpo es dirigido al compartimiento de célula donde la proteína es comúnmente activa. Los cambios fenotípicos observados pueden proporcionar revelaciones potentes acerca de la relevancia de la proteína para una condición en la cual se ha observado su abundancia, mediante la generación de la biblioteca de anticuerpos de sustracción, a ser disminuido.

40 [0083] En otro aspecto, las muestras de anticuerpos individuales múltiples de una biblioteca de anticuerpo de sustracción o completa según la invención se inmovilizan en posiciones diferentes en una matriz en una superficie sólida. Esta matriz luego puede ser expuesta a una preparación con las proteínas de un tipo de célula o compartimiento de célula elegido que se desea caracterizar, de modo que para aquellos anticuerpos cuyo antígenos de proteína cognada están presentes, la unión ocurre en la superficie sólida. La unión se puede evaluar más convenientemente etiquetando las proteínas en la preparación a ser caracterizadas con una etiqueta fácilmente detectable, tal como un fluorescente u otro grupo químico ópticamente detectable, o un metal (en particular, oro o plata) o un radiomarcaje, de modo que la presencia de material enlazado se revela por la acumulación de la marca en los loci de anticuerpos individuales en la matriz. El modelo de unión se puede evaluar particularmente eficazmente en los casos en los que la matriz de anticuerpos se inmovilice en un chip adecuado para la lectura con un dispositivo óptico de formación de imágenes.

50 [0084] La inmovilización de los anticuerpos en la superficie se puede conseguir a través de acoplamiento covalente o a través de interacciones no covalentes. Con este fin, se pueden derivatizar los anticuerpos con cualquier grupo químicos adecuado, con la condición de que esto no interfiera con su capacidades de unión, y opcionalmente pueden ser provistos de una extensión peptídica, codificada a nivel de ADN, a través de lo cual puede conseguirse convenientemente el acoplamiento. En una forma de realización preferida, los anticuerpos son biotinilados, permitiendo así que sean enlazados en una superficie derivatizada con estreptavidina. La biotiniación se puede llevar a cabo *in vitro*, por métodos convencionales, o *in vivo*, proporcionando los anticuerpos con una extensión peptídica adecuada, donde se ha determinado que la secuencia de dicha extensión específica la biotiniación en las especies huéspedes en las cuales los anticuerpos son expresados (Schatz, Biotechnology 11, 1138-1143 (1993)).

60 [0085] Las matrices de anticuerpos se puede construir con cualquier conjunto de anticuerpos. La identidad, o al menos la secuencia, de la proteína a la que cada anticuerpo individual es capaz de enlazarse es preferiblemente conocido. Estas matrices hacen posible determinar cuáles de estos antígenos de proteína están presentes, y aproximadamente en qué cantidad, en una muestra de contenido de proteína desconocido. Por ejemplo, una vez

que una biblioteca de anticuerpo completa para un tipo de célula, o compartimiento de la misma, se ha construido e incorporado en una matriz, entonces es posible comparar la distribución de proteínas en un segundo tipo de célula fenotípicamente diferente: si, por ejemplo, una proteína que estaba presente en el tipo de célula de referencia también está presente en el segundo tipo de célula, esto se puede revelar detectando el enlace a un anticuerpo cognado en la matriz.

[0086] También es posible ganar una indicación aproximada de la abundancia relativa de proteínas individuales en dos muestras relacionadas, tal como dos tipos de célula diferentes o células con historias diferentes. Por ejemplo, las proteínas en una de las muestras mencionadas se pueden marcar con una marca detectable mientras que las proteínas en la segunda muestra mencionada se marcan con una marca distinguible diferente. Una mezcla de las dos muestras luego es colocada en contacto con una matriz de anticuerpos según la invención y se determinan las cantidades relativas de las proteínas alternativamente marcadas enlazadas a anticuerpos individuales en la matriz. Por ejemplo, si las marcas son grupos fluorescentes, esto se puede conseguir midiendo la intensidad a la máxima de emisión respectiva de los indetificativos alternativos. Las diferencias en la expresión de proteína entre tipos de célula, por ejemplo entre células de diferente edad, se puede evaluar por medio de estos métodos y los resultados se pueden comparar con los obtenidos usando matrices de gen.

[0087] El concepto concretado en esta descripción del uso de una matriz de anticuerpos para proporcionar un perfil de un tipo de célula elegida o compartimiento de la misma, en cuanto a las proteínas que están presentes en dicha célula o compartimiento claramente es comparable con el uso de matrices de ADN, que actualmente se está convirtiendo en una herramienta para la caracterización de la distribución de especies de ARNm en un tipo de célula elegida. Se puede aplicar tecnología de formación de imágenes de matrices similar en ambos casos, aunque los principios biológicos subyacentes de los métodos y las técnicas para la construcción de las matrices son completamente diferentes. En ambos casos, el objetivo es obtener una perspectiva en la gama completa de actividades metabólicas en el tipo de célula elegida, como se refleja en las proteínas que están presentes para controlar y facilitarlas. La ventaja clave del conjunto de anticuerpos es que permite una evaluación directa y semi-cuantitativa del contenido de proteína de un tipo de célula dada y es ésta la que determina las propiedades funcionales de la célula, mucho más directamente que las cantidades de diferentes ARNm que pueden estar presentes. Además, puesto que las proteínas son generalmente mucho más estables que los ARNm, se esperaría que los resultados obtenibles con la matriz de anticuerpos sea menos dependiente en los detalles del protocolo experimental seguido. Otra ventaja es que la robustez de los anticuerpos significa que las matrices basadas en los mismos pueden usarse varias veces, con eliminación completa de antígenos enlazados en el medio, sin pérdida de calidad de los resultados obtenibles. El uso de VHH en la matriz proporciona varias ventajas, tal como una mejora de sensibilidad/resolución en a el orden de 10 a 100 veces, y la detección de proteínas modificadas post-traduccionalmente.

[0088] Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración únicamente.

EJEMPLO 1. Preparación de proteínas citoplásmicas de *S. cerevisiae* cultivadas bajo condiciones diferentes.

[0089] Un litro de medio de YNB (base nitrogenada de levadura al 0,67 %) conteniendo glucosa al 2% y otro litro de medio de YNB con galactosa al 2% fueron inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* y fueron cultivados hasta alcanzar un OD660 de 1. las células fueron cosechadas (10 minutos 7.000 x g) y resuspendidas en 40 ml de suero salino tamponado en fosfato (PBS). Las células fueron lisadas a 20.000 Psi en una prensa francesa. Las células y membranas celulares enteras fueron quitadas de los lisatos por centrifugado. Las fracciones de membrana y ribosomas fueron quitadas de los sobrenadantes por ultra centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos. Todos los lisatos claros contienen proteínas intracelulares solubles en una concentración de proteína total de aproximadamente 10 mg/ml.

EJEMPLO 2. Introducción de una respuesta inmunitaria humoral en llama.

[0090] Una llama hembra fue inmunizada con extracto de levadura cultivado en galactosa (YEgal) en suero salino tamponado con fosfato (PBS) subcutáneamente e intramuscularmente. Por inmunización se inyectaron 2 ml con 5 mg, 5 mg, 2,5

mg y 1.25 mg de YEgal respectivamente. Las inmunizaciones fueron realizadas según el siguiente cronograma: la segunda inmunización fue realizada cuatro semanas después de la primera inyección y la tercera inmunización nuevamente cuatro semanas después de la segunda. La respuesta inmunitaria fue seguida de titulación de muestras de suero en ELISA con YEgal inmovilizado en placas Nunc maxi-sorb (solución de recubrimiento 10 µg/ml de YE diluida en PBS). Tras la incubación con suero, los anticuerpos de llama enlazados fueron detectados con antisuero policlonal anti-llama desarrollado en conejo (obtenido por medio de inmunización de conejos con inmunoglobulinas de llama purificada por medio de columnas ProtA y ProtG ; ID-DLO) y anti-inmunoglobulinas de conejo producido en cerdo (DAKO) conjugadas a peroxidasa de rábano. Finalmente, se determinó la actividad enzimática de peroxidasa con tetrametil benzidina y peróxido de urea como sustrato y, después de la terminación de la reacción añadiendo H₂ SO₄, se midió la densidad óptica a 450 nm.

[0091] Las transferencias Western con las proteínas de YEgal y YEglu fueron incubadas con anticuerpos pre y post suero y revelaron una respuesta fuerte contra el espectro entero de proteínas después de la inmunización.

EJEMPLO 3. Clonación, selección y análisis de fragmentos de VHH de llama

3.1 Aislamiento de (fragmentos de VHH contra proteínas de YEgal.

[0092] De la llama, respondiendo positivamente contra YEgal según evaluación con ELISA, se tomó una muestra de sangre de aproximadamente 200 ml y se obtuvo una población enriquecida de linfocitos por medio de centrifugado en un gradiente discontinuo Ficoll (Pharmacia). De estas células, el ARN total fue aislado por extracción de tiocianato de guanidino (p. ej. por medio del método descrito por Chomczynski and Sacchi (1987), Analytical Biochem., 162, 156-159). Después de la síntesis de la primera cadena de ADNc usando MMLV- RT (Gibco-BRL) y cebadores oligonucleótidos aleatorios (Pharmacia), los fragmentos de ADN que codifican fragmentos de VHH y parte de la región bisagra corta o larga fueron amplificados por PCR usando cebadores específicos:

*Pst*I

Lam-17 5'-GAGGTBCARCTGCAGGASTCYGG-3'

SEQ ID No:1

S = C or G, R = A or G, W = A and T,

*Hind*III

*Not*I

Lam-07

5'-AACAGTTAAGCTTCOGCTTGCGGCCGCGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGGC-3'

(short hinge)

SEQ ID No:2

*Hind*III

*Not*I

Lam-08

5'-AACAGTTAAGCTTCOGCTTGCGGCCGCTGGTTGTGGTFTTGGTGTCTTGGGT-3'

(long hinge)

SEQ ID No:3

[0093] Los fragmentos de ADN generados por PCR fueron digeridos con *Pst*I (coincidiendo con el codón 4 y 5 del dominio V_H H, codificando los aminoácidos L-Q) y *Not*I (introducido en el 5' extremo de los cebadores oligonucleótidos específicos de bisagra, coincidiendo con la secuencia de aminoácidoa A-A-A), y clonado en el vector de fagémido pUR5071 como fragmentos de gen que codifican el dominio V_H H incluyendo la región bisagra fundida a la proteína del gene III del bacteriófago de M13 de *E.coli*, permitiendo así la expresión del fragmento de anticuerpos en la superficie del fago filamentoso (McCafferty et al (1990), Nature, 6, 552- 554).

3.2 El enriquecimiento de orotidina-5-monofosfato-decarboxilasa (OMCase) enlazando dominios VHH por medio de la metodología de expresión en fago

[0094] Se construyó una biblioteca de expresión con 1x10⁹ clones, de los cuales 75% contenían un inserto completo de codificación de V_H H, fue construido en vector de fagémido pUR5071. Se prepararon partículas de fago que exponían fragmentos V_H H por infección de células de *E. coli* que albergan el fagémido con fago auxiliar VCS-M13 (Marks et al (1991), J. Mol. Biol., 222, 581-597). Por precipitación de fago del sobrenadante del cultivo con PEG6000, fragmentos de V_H H libres fueron extraídos, evitando así una competencia perturbadora para unirse al antígeno entre os dominios de V_H H libres y los unidos al fago. Los anticuerpos de fago fueron incubados con OMCase biotinilado in vitro. Se extrajeron partículas de fago asociadas áridas de complejos de anticuerpo de antígeno de la solución con perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (DAKO) (véase Hawkins et al (1992), J. Mol. Biol., 226, 889-896). Después de un procedimiento de lavado prolongado, el gafo de *E. coli* fue eluido de perlas con 0,1 M de trietilamina (Baker) por disrupción de la unión de anticuerpos de antígeno con este impacto alcalino.

Después de la neutralización con 0,5 de volumen de 1 M de Tris-HCl pH 7.4, el fago fue rescatado por transfección en el huésped de *E. coli* TG1. Se realizó una selección renovada con fago obtenido a partir de la población transfectada de bacterias de *E. coli* como se describió anteriormente.

5 [0095] Los clones de *E. coli* individuales obtenidos después de tres etapas de selección fueron cultivadas en pocillos de placas de microtitulación y la producción fue inducida por la adición de isopropilo- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, 0,1 mM). Después de 16 horas de cultivo, el sobrenadante del cultivo de los clones fue analizado en ELISA para detectar la presencia de fragmentos de V_H H, que específicamente enlazan con OMPcase biotinilado inmovilizado en placas de ELISA recubiertas con estreptavidina. Los fragmentos de V_H H enlazados fueron detectados con anticuerpo monoclonal anti-myc de ratón seguido de incubación con policlonal anti-ratón de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (DAKO).

10 [0096] En transferencias Western con OMCcase purificado y ambos extractos, la enzima fue reconocida por el fragmento de V_H H obtenidos. Este ejemplo muestra que se puede seleccionar fragmentos de anticuerpos de la biblioteca incluso contra proteínas, que están presente en concentraciones bajas.

3.3 Enriquecimiento de proteínas YEGal uniendo dominios VHH por medio de metodología de expresión en fago.

15 [0097] La biblioteca de expresión en fago descrita en la sección 3.2 también se utilizó para el aislamiento de fragmentos de anticuerpos que reconocen proteínas de YEGal. Las partículas de fago que expresan el anticuerpo fueron purificadas por precipitación con PEG y posteriormente fueron incubadas con proteínas de YEGal biotinilado in vitro. Se extrajeron complejos de anticuerpo de antígeno y partículas de fago asociadas de la solución con Plus (Pierce) inmovilizado con estreptavidina Ultralink™. Se utilizó Ultralink en vez de Dynabeads debido a su más alta capacidad de enlac. Después de un procedimiento de lavado prolongado, el fago de *E. coli* fue eluido del material de columna con 0,1 M de trietilamina. Después, el fago de neutralización fue rescatado por transfección en el huésped de *E. coli* TG1. Se realizó una selección renovada con fago obtenido a partir de la población transfectada de bacterias de *E. coli* como se describió anteriormente.

20 [0098] Se seleccionaron clones de *E. coli* individuales obtenidos después de dos etapas de selección para la producción de fragmentos V_H H que reconocen antígenos presentes en el extracto de proteína de YEGal. Los fragmentos V_H H presentes en el sobrenadante del cultivo fueron capturados por anticuerpo monoclonal anti-MYC recubierto en placa de ELISA. Tras la incubación con extracto DE YEGal biotinilado específicamente enlazado, se detectaron proteínas biotiniladas con peroxidasa de rábano conjugada con streptavidina (BIORAD).

25 3.4 Enriquecimiento de proteínas específicas de galactosa que se unen a dominios VHH por medio de la contraselección con YEGlu y metodología de expresión en fago.

30 [0099] Las partículas de fago se produjeron como se ha descrito anteriormente en la sección 3.11. Los fagos fueron incubados con un exceso de YEGlu (no biotinilado) antes de añadir YEGal biotinilado. Se extrajeron los complejos de anticuerpo de antígeno y partículas de fago asociadas de la solución con Plus de estreptavidina inmovilizado con Ultralink™. Después de un procedimiento de lavado prolongado para eliminar todas las partículas de fago no enlazadas y todas las partículas de fago asociadas a proteínas no biotiniladas, el fago de *E. coli* fue eluido del material de columna con 0,1 M de trietilamina. Después, el fago de neutralización fue rescatado por transfección en el huésped de *E. coli* TG1. Una contraselección renovada fue realizada con fago obtenido a partir de la población transfectada de las bacterias de *E. coli* según se describió anteriormente.

35 [0100] Los clones de *E. coli* individuales obtenidos después de dos ciclos de contraselección fueron cultivados en pocillos de placas de microtitulación, y la producción de fragmentos de V_H H fue inducida por la adición de isopropilo- β -D-tiogalactopiranosido. Después de 16 horas de cultivo, se capturaron fragmentos de V_H H presentes en el sobrenadante del cultivo de los clones por medio de anticuerpo anti-MYC monoclonal inmovilizado. Siguió una incubación con YEGal biotinilado o en el pocillo duplicado con YEGlu biotinilado. Se detectaron proteínas biotiniladas enlazadas con peroxidasa de rábano conjugada con streptavidina (BIORAD).

40 **EJEMPLO 4.** De fragmentos de VHH contra todos los ORF de *S. cerevisiae* usando robótica

4.1 Estrategia para selección y el análisis

45 [0101] De la recogida de clones de levadura, expresando todos los ORF 6200 como proteínas de fusión con GST, se purificaron los antígenos para selecciones con Gluthathione-Uniflow Resin (Clontech). La purificación se realizó en cultivos agrupados, produciendo así una mezcla de diferentes productos de fusión a ORF-GST. Para ello, se tomó un volumen igual de cada cultivo de placas maestras de 96 pocillos con provisiones de DMSO (Genetic Research) como inóculo para iniciar un cultivo. La mezcla purificada fue recubierta para selección por afinidad, mientras se agregó GST libre a la solución de fago, perdiendo así los clones que producen de fragmentos de VHH específicos de GST. Después, una única selección en un gran número de clones fue escogida con un robot

50 y fue recogida en filtros para análisis de su especificidad como se describió (De Wildt et al., Nature Biotechnology, 18 (2000)). Después del cultivo de las colonias en placas con glucosa para reprimir la producción de anticuerpos, se extrajeron los filtros y fueron transferidos a nuevas placas de agar para inducción con IPTG. Entre la lámina con las colonias y la superficie de la placa se colocó una cantidad de otros filtros de nitrocelulosa con diferentes antígenos y

fueron bloqueados con una proteína irrelevante, tal como BSA; el antígeno con filtros puede capturar fragmentos de anticuerpos específicos de antígeno, los cuales se difunden a través de este conjunto de filtros. Los fragmentos de VHH enlazados se puede visualizar mediante sus secuencias de marcas o con un anticuerpo policlonal anti VHH de conejo, revelando así qué anticuerpo producido por los clones recogidos reconoce un ORF determinado. Preferiblemente, los filtros se incuban con veinte depósitos de ORF, compuestos por los clones recogidos de las ochos columnas y las doce filas de las placas maestras de 96 pocillos. Usando veinte filtros, se pueden seleccionar gran número de filtros de clones contra 96 antígenos, produciendo suficiente información para deducir el reconocimiento de antígeno de todos los fragmentos de VHH individuales. Usando estos métodos, el gran número de diferentes fragmentos de VHH, que se necesitan para generar la matriz de anticuerpos, se selecciona y analiza rápidamente.

4.2 Metodología de selección de alto rendimiento

[0102] Esta sección ejemplifica el denominado método de selección de micro-panning anteriormente descrito en la descripción detallada. Los pocillos de placa de microtitulación fueron recubiertos con solución de antígeno (partiendo a 100 µg/ml por pocillo para la primera ronda de selección con la biblioteca naive de el llama/camello) y después del bloqueo incubado con fago de entrada, que se puede agregar en diluciones en serie (diluciones con factor de dilución de 10, 100 µl/pocillo en 2% Marvel, 1% BSA, 0,05% Tween-20 en PBS, pH 7,4). Como un control negativo, las mismas muestras de fago de entrada fueron agregadas a pocillos no recubiertos. Las placas de microtitulación fueron incubadas durante una a dos horas en un agitador de microplaca y posteriormente fueron lavadas (15x PBS-T, 3x PBS, 250 µl/pocillo). Después del lavado, la mitad de la placa fue eluida con 100 µl 0,1 M de trietilamina durante 20 minutos. Las muestras eluidas fueron neutralizadas con 50 µl 1 M de Tris-HCl pH 7,5. El fago eluido fue recuperado añadiendo 75 a 150 µl de eluato a 600 µl de medio 2TY y 250 µl de células TG-1 seguido de incubación a 37 °C durante 30 minutos. Tras la incubación, 100 µl de cada muestra fueron colocados en placas de agar de amp/glu LB. Las células restantes fueron centrifugadas y los gránulos fueron resuspendidos en 5 ml de 2TY amp/glu y cultivados durante 16 horas en un agitador a 37 °C. De estos cultivos, se hicieron provisiones de glicerol o se produjo fago para una siguiente etapa de selección.

[0103] Después de la elución del fago de la mitad de la placa de microtitulación, la placa entera fue lavada con PBST y fue incubada con suero anti p8 de conejo (1:5.000) durante una hora a RT. Los anticuerpos anti-p8 fueron detectado con IgG anticonejo de puerco conjugado con HRP (DAKO).

[0104] Los resultados de las selecciones con un autoantígeno, fragmento de VHH 2E3 que reconoce una proteína en un extracto de tomate, usando una biblioteca de dominio simple de llama, se muestran en la tabla 2. En la primera ronda se utilizaron varias diluciones (con factor de dilución 1 a 1000) de fago de entrada, que ilustran que una entrada inferior puede dar bases inferiores (comparación 1x con 10x), mientras que el número de fago eluido del tubo recubierto con 2E3 no cambió. El número de fago eluido se correlaciona bien con la lectura de ELISA de fago. Para la segunda ronda de panning se utilizó el fago de salida de las diferentes diluciones de la primera ronda, nuevamente en diferentes diluciones. Los mejores resultados, es decir, el máximo resultado frente a antecedentes mínimos, fueron encontrados cuando se utilizó como entrada la dilución de factor 10 desde la primera ronda.

Tabla 2 Resultados de la selección en una biblioteca no inmune de llama con VHH 2E3

(B) Ronda de panning 1 (VHH 2E3 revestido a 50 µg/ml)				
N.º de fagos de entrada	Fago ELISA (OD450)		N.º de fagos eluidos	
	2E3-VHH	Sin revestimiento	2E3-VHH	Sin revestimientos
R1 (1x) = 9 x 10e11	0.204	-0.017	8 x 10e3	660
R1 (10x) = 9 x 10e10	0.039	-0.001	8 x 10e3	70
R1 (100x) = 9 x 10e9	0.007	-0.001	500	30
R1 (1000x) = 9 x 10e8	-0.009	-0.015	220	0
(B) Ronda de panning 2 (VHH 2E3 revestido a 10 µg/ml)				
N.º de fagos de entrada	Fago ELISA (OD450)		N.º de fagos eluidos	
	2E3-VHH	Sin revestimiento	2E3-VHH	Sin revestimientos
R2 (10x) = 1 x 10e11	1.870	0.002	± 10e6	500

ES 2 368 623 T3

R2 (100x) = 1 x 10e10.	2.003	-0.015	± 10e6	10
R2 (1000x) = 1 x 10e9	2.116	-0.019	± 10e5	10
R2 (10000x) = 1 x 10e8	1.200	-0.016	± 10e4	0
N.º de fagos de entrada	Fago ELISA (OD450)		N.º de fagos eluidos	
R1 (10x)	2E3-VHH	Sin revestimiento	2E3-VHH	Sin revestimiento
R2 (10x) = 8 x 10e10	1.602	0.002	± 10e6	360
R2 (100x) = 8 x 10e9	2.558	-0.015	± 10e6	60
R2 (1000x) = 8 x 10e8	2.119	-0.015 ±	5 x 10e5	10
R2 (10000x) = 8 x 10e7	1.340	-0.013 ±	5 x 10e4	0
R1 (100x)	2E3-VHH	Sin revestimiento	2E3-VHH	Sin revestimiento
R2 (10x) = 4 x 10e10	2.112	0.000	± 10e6	600
R2 (100x) = 4 x 10e9	2.605	-0.015	± 10e6	150
R2 (1000x) = 4 x 10e8	2.040	-0.017	± 10e6	0
R2 (10000x) = 4 x 10e7	0.758	-0.016 ±	5 x 10e4	10

- 5 [0105] El segundo ejemplo muestra los resultados de la selección con el azocolorante (RedReactive-6 RR6) acoplado a BSA. Se detectaron OD algo bajos en la primera ronda de selección con el fago ELISA correspondiente con números bajos de fago eluido con la mejor proporción defago específico de RR6 contra antecedentes en entrada diluida co factor de dilución de 10 (tabla 3). La segunda ronda de panning dio señales mucho más altas en el fago ELISA al igual que números más altos de fago eluido con aprox. 10 % antecedentes. Una fracción algo alta de los fragmentos obtenida después de la ronda 2, que fueron analizados en ELISA, resultaron reaccionar con el colorante (>50%), mientras un bajo número de anticuerpos reconoce la proteína portadora BSA (10%).

Tabla 3

Resultados de la selección en una biblioteca de llama no inmune con RR6-BSA				
(B) Ronda de panning 1 (RR6-BSA recubierto a 50 µg/ml).				
N.º de fagos de entrada	Fago ELISA (OD450)		N.º de fagos eluidos	
	BSA-RR-6	Sin revestimiento	BSA-RR-6	Sin revestimiento
R1 (1x) = 9 x 10e11	0.026	-0.017	770	660
R1 (10x) = 9 x 10e10	0.013	-0.001	400	70
R1 (100x) = 9 x 10e9	0.007	-0.002	0	30
R1 (1000x) = 9 x 10e8	0.006	-0.015	10	0
(B) Ronda de panning 2 (RR6-BSA revestido a 10 µg/ml)				
N.º de fagos de entrada	Fago ELISA (OD450)		N.º de fagos eluidos	
	BSA-RR-6	Sin revestimiento	BSA-RR-6	Sin revestimiento
R1 (1x)				
R2 (10x)= 1 x 10e11	1.925	0.955	± 10e6	± 10e5
R2 (100x) = 1 x 10e10	1.876	0.147	± 10e5	± 8 x 10e3
R2 (1000x) = 1 x 10e9	0.690	0.004	± 5 x 10e4	1250

ES 2 368 623 T3

R2 (10000x) = 1 x 10e8	0.165	0.004	± 5 x 10e3	200
N.º de fagos de entrada	Fago ELISA (OD450)		N.º de fagos eluidos	
R1 (10x)	BSA-RR-6	Sin revestimiento	2E3-VHH	Sin revestimiento
R2 (10x) = 7.5 x 10e10	1.752	1.148	± 10e6	± 10e5
R2 (100x) = 7.5 x 10e9	1.738	0.425	± 10e6	± 5 x 10e4
R2 (1000x) = 7.5 x 10e8	0.474	0.042	± 5 x 10e4	± 5 x 10e3
R2 (10000x)=7.5 x 10e7	0.129	-0.006	± 5 x 10e3	1500
(C) Selección de ELISA screening con VHH soluble en enlace a conjugado de RR6-BSA y BSA (revestido a 10 µg/ml).				
Ronda de panning	N.º de pos de ELISA (OD450>0.4) / n.º probado			
	RR-6	BSA		
R1 (1x)	0 / 16	0 / 16		
R1 (10x)	1 / 16	1 / 16		
R1 (1x) / R2 (10.000x)	13 / 24	0 / 24		
R1 (10x) / R2 (10.000x)	12 / 24	2 / 24		

EJEMPLO 5.

5.1. Preparación de proteínas a partir de tejidos musculares saludables y enfermos

5 [0106] Un bioPt de tejido muscular fue homogenizado con un Potter en 1 ml de tampón. Las membranas fueron granuladas por centrifugado de velocidad baja. La fracción de membrana fue resuspendida en 1 ml de tampón. Usando este protocolo, se obtuvo una fracción citosólica con 4,5 mg de proteína y una fracción de membrana con 1 mg de proteína. La calidad de las fracciones se determinó en un gel manchado con Coomassie, revelando conjuntos completamente diferentes de proteínas para las fracciones de membrana y citosólico.

5.2. Inducción de una respuesta humoral en llama contra proteínas musculares

10 [0107] Se utilizan protocolos similares a los descritos en el ejemplo 2; la llama fue inmunizada cuatro veces con una mezcla de 600 µg de proteína citosólica y 125 µg de proteína de membrana por inyección.

5.3. Clonación, selección y análisis de fragmentos VHH llama dirigido contra tejidos musculares.

15 [0108] Se usan protocolos similares a los descritos en el ejemplo 3.1. Se realizaron selecciones con proteínas citoplásmicas biotiniladas in vitro, mientras se alcanzó selección por afinidad con proteínas de membrana disolviendo la suspensión en úrea (8

M en PBS) y uso de esta solución estándar diluida en PBS para recubrimiento de un inmunotubo.

5.4. Selección en un subconjunto de proteínas musculares expresadas como productos marcados con epítipo

[0109] Son de interés particular para el distrofia muscular, FSHD y otras distrofias musculares las siguientes proteínas, de las cual se han construidos versiones marcadas según procedimientos estándares:

20 FRG 1 (Gen de región 1 de distrofia muscular facioescapulohumeral)

FRG 2 (Gen 2 relacionado con FSHD)

PABP 2 (proteína de enlace de poliadenilato 2)

Emerina (proteína de membrana nuclear, distrofia muscular de Emery Dreifuss);

Calpaina -3 (tipo de distrofia muscular de cintura 2A)

25 Caveolina 3 (tipo de distrofia muscular de cintura 1C)

Desmina (miopatía por almacenamiento de desmina)

SIR2L (homólogo SIR2 al humano)

[0110] Las siguientes proteínas marcadas son de interés no sólo para distrofias musculares:

HP1 α (Homólogo de proteína de heterocromatina de *Drosophila*)

HP1 β (Homólogo de proteína de heterocromatina de *Drosophila*)

HP1 γ (Homólogo de proteína de heterocromatina de *Drosophila*)

5 [0111] Estas proteínas marcadas se utilizaron para selecciones según el protocolo descrito en el ejemplo 4.

EJEMPLO 6.

6.1. Preparación de proteínas de células de CaCo-2 (un tipo célula de tejido epitelial intestinal)

10 [0112] Células de CaCo-2 fueron colocadas en placas en matraces de cultivo de 185 cm; el medio (DMEM suplementado con 20% H.I. suero fetal bovino y gentamicina se cambió cada dos días. Después de un mes de cultivo, las células fueron recogidas lavando dos veces con PBS y raspando en PBS-inh (con inhibidores de proteasa). Después del centrifugado (5 minutos a 700 xg), el granulado de célula fue resuspendido en 15 ml de PBS y lisado pasando diez veces a través de un jeringa de 22G. El centrifugado de velocidad baja (5 minutos a 700 x g) produjo una fracción de sobrenadante con las proteínas citosólicas (38,9 mg). El granulado fue pasado nuevamente a través de la jeringa y centrifugado a velocidad rápida (60 minutos a 10.000 x g en un rotor SS34) para producir las proteínas enlazadas de la membrana en el granulado (28,2 mg) y proteínas citosólicas adicionales (6,1 mg) en el sobrenadante.

6.2. Inducción de una respuesta inmunitaria humoral en llama contra proteínas CaCo-2

[0113] Se utilizaron protocolos similares a los descritos en el ejemplo 3.1.

6.3. Clonación, selección y análisis de fragmentos de VHH de llama dirigidos contra proteínas de CaCo-2

20 [0114] Se utilizaron protocolos similares a los descritos en el ejemplo 3.1. El análisis de transferencia Western usando los extractos hervidos en tampón de muestra de reducción mostró que los anticuerpos de la llama inmunizada reconocen gran número de proteínas diferentes.

EJEMPLO 7.

7.1. Preparación de proteínas de tejido intestinal (membranas de Brush Border) de cerdos

25 [0115] Tres cerdos (3 semanas después del destete con un peso de 10-15 kg, codificados 3602, 3611 y 3613) fueron desangrados bajo anestesia Nembutal. Fracciones de membranas de Brush Border fueron preparadas a partir de segmentos intestinales como se describió (Sellwood R. et al., J. Med. Microbiol. 8:405-411 (1975)). Se quitó el intestino delgado de los animales, y la(s) sección(s) pertinente(s) fue/ fueron cortada(s), y se colocaron en hielo en PBS13. Los segmentos intestinales, cada uno compuesto de una sección de un metro, fueron tomados de cinco lugares diferentes: (A) duodeno anterior; (B) entre A y C, (C) yeyuno mediano, (D) entre C y E, y (E) íleon posterior.

30 [0116] Se cortó y se abrió el segmento intestinal, y la mucosa fue raspada en un vaso de precipitación con 0,005 M de EDTA/PBS13 frío pH 7,4. El material fue homogenizado en una mezcladora Waring durante 20 seg. a marcha rápida. El homogenado resultante fue tamizado a través de gasa médica (van Heek Medical) para eliminar partículas gruesas, y posteriormente fue centrifugado a 15 min a 700 x g a 4 °C (Sorvall, rotor GSA). El granulado resultante fue resuspendido en solución hipotónica de EDTA (0,005 M de EDTA, ajustado a pH 7,4 con 0,5 M de Na₂ CO₃), y fue centrifugado a 800 x g, 15 min. 4 °C. El lavado fue repetido (5-10 veces) con EDTA hipotónico, mientras se reducía la velocidad de centrifugado con 100 x g en cada etapa bajo control microscópico constante del sobrenadante y el granulado para membranas de Brush Border (BBM). El procedimiento fue detenido cuando ningún material fue eliminado por lavado del granulado, y se obtuvo un granulado de BBM microscópicamente puro.

40 7.2. Inducción de una respuesta inmunitaria humoral en proteínas de tejido intestinal

[0117] Para inmunización de tres llamas diferentes, los gránulos de BBM de los diferentes segmentos intestinales se utilizaron de la siguiente manera:

- sección (A) duodeno anterior, 5 ml de material en total, usado para inmunización de llama 591;

- sección (C) yeyuno mediano, 5 ml de material, usado para inmunización de llama 617,

45 - sección (D) entre yeyuno mediano e íleon posterior (2 ml), combinado con sección (E) íleon posterior (2 ml), usado para inmunización de llama 2587.

[0118] Los gránulos (5 ml para las secciones (A) y (C) y 4 ml de las secciones combinadas (D) y (E)) fueron diluidos añadiendo 4 ml de PBS13. De esta mezcla, 1 ml fue mezclado con 1 ml de PBS y 3 ml de Specol. Después de la homogenización, el volumen total (5 ml) fue inyectado en una llama, 50% intramuscularmente y 50% subcutáneamente, según el protocolo estándar para inmunización de llamas. Se realizaron tres inmunizaciones consecutivas con intervalos mensuales. El resto del granulado fue almacenado congelado a -20 °C en PBS 13/glicerol (50% (v/v)).

[0119] La respuesta inmunitaria contra la mezcla de antígenos fue analizada con transferencia Western, revelando que un amplio espectro de proteínas fueron detectadas por los anticuerpos policlonales de los sueros después de la inmunización.

7.3. Clonación, selección y análisis de fragmentos de VHH de llama dirigidos contra tejido intestinal

5 [0120] Se utilizaron protocolos similares como los descritos en el ejemplo 3.1. Los métodos de substracción según se describen en el Ejemplo 3.4 fueron aplicados para generar anticuerpos que reconocen antígenos específicos de segmento intestinal. Estos antígenos fueron identificados por electroforesis bidimensional y transferencia Western combinada con secuenciación de amino terminal y/o espectrometría de masas.

EJEMPLO 8.

10 8.1. Construcción de matrices de proteína basadas en VHH

[0121] La inmovilización de anticuerpos de llama en superficies sólidas, tal como chips, se logró por adsorción (no covalente) o por acoplamiento covalente dirigido por fi. usando grupos amino (de lisinas o del amino terminal) de los fragmentos de anticuerpos a grupos carboxilo activados en la superficie sólida por acoplamiento convencional de carbodiimida usando 1 etil-3-[3- dimetil aminopropil] carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) como se describió en la patente de Unilever (T3082). Alternativamente, se utilizaron secuencias con marca especiales para dirigir enlace no covalente a una molécula "receptora" inmovilizada que interactúa con esta marca. Un ejemplo es la marca, que dirige la biotilación in vivo del fragmento de VHH por *Escherichia coli* (Schatz, P.J. Biotecnología 11, 1138-1143 (1993), y así facilita la inmovilización sencilla sin purificación previa por la por la interacción de afinidad alta con la estreptavidina inmovilizada.

20 [0122] Un conjunto de aproximadamente 100 (fragmentos de VHH que reconocen diferentes ORF de *S. cerevisiae* (descritos en el ejemplo 4.1) fue reclonada en el vector de producción de *E. coli* produciendo fragmentos biotilados y marcados con C-MYC/His6.

25 [0123] Las marcas usadas fueron C-MYC (en negrita en SEC ID. n.º:3), reconocidas por anticuerpo monoclonal 9E10 (Munro, S., and Pelham, H.R., Cell 46, 291-300 (1986)), seguido de un péptido12-mer que codifica una señal de biotilación de in vivo (en negrita y subrayado) y la cola de hexahistidina (cursiva) para purificación con IMAC (Hochuli, E. et al., Biotechnology 6, 1321-1325 (1988)). La secuencia completa fundida al terminal de carboxi del VHH se presenta a continuación:

EQKLISEEDLN GAA *LRSIFEAQKMEW* HHHHHH

30 [0124] SEC ID n.º:4 Los fragmentos de VHH presentes en sobrenadantes bacterianos fueron agrupados en un chip recubierto con estreptavidina. Del *S. cerevisiae* cultivado bajo dos extractos de proteína citosólica de regímenes diferentes (preparados como se describe en el ejemplo 1) fueron marcados con FITC y Ci5 según métodos sugeridos por los proveedores de equipos (Pierce). El chip fue incubado con un a mezcla de 1:1 de ambos extractos de proteína diferencialmente marcados y la respuesta fue visualizada después del lavado. Se obtuvo una imagen clara de las proteínas con regulación hacia arriba y hacia abajo.

35 8.2 Matriz de anti Ig de ratón

8.2.1 Selección de VHH de subclase de IgG de ratón de reactividad cruzada y específicos

[0125] Los anticuerpos y fragmentos Fc usados como antígenos en la selección y el análisis de los fragmentos de anticuerpos se presentan en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Anticuerpos y fragmentos de Fc usados en los experimentos de selección y análisis		
Nombre	Subclase + LC	Fuente
α-RR6	IgG1-κ	Unilever Research Vlaardingen
α-Traseolide (02/05/01)	IgG1-κ	MCA
α-MYC	IgG1-κ	MCA
α-TAG	IgG2a-κ	Unilever Research Vlaardingen
HOPC-1	IgG2a-λ	Sigma
MOPC-141	IgG2b-κ	Sigma
α-Muc	IgG3-κ	Unilever Research Colworth
M9019	IgG3-λ	Sigma
MoFc		Jackson Immunoresearch

HuFc	Jackson Immunoresearch
------	------------------------

[0126] En los días 0, 22, 43 y 85 la llama 2590 fue inmunizada con α -Traseolida de ratón y con α -TAG mAB. La llama 2591 fue inmunizada en los días 0, 22 y 64 con fragmentos constantes de inmunoglobulinas humanas y de ratón.

5 [0127] Después de la última inmunización, los linfocitos B fueron aislados de la sangre. El ARN total fue extraído de las células B y luego se usaron como un molde en cebado aleatorio RT-PCR. Los segmentos de gen que codifican los dominios variables de dominio simple fueron amplificados en ADNc de cebado aleatorio y clonados en pUR5071 como se describió anteriormente. El tamaño de la biblioteca resultante fue aproximadamente 10^9 .

10 [0128] La inmunización de las llamas 2590 e 2591 dio un resultado de una biblioteca de fago α -Mab y α -Fc Fc, respectivamente. Se realizó una primera ronda de selección en el ratón de antígenos IgG1 y MoFc con ambas bibliotecas. Todas las selecciones dieron como resultado un enriquecimiento de la población de fago de 5 a 10 veces.

15 [0129] Este procedimiento de selección fue seguido de dos etapas más de selección. Para una etapa de selección posterior, se bajó la concentración de antígeno de 30 nM a 5 nM. Una fracción de los fagos de salida de la ronda 2 no fue salvada y amplificada, pero fue dializada contra PBS y directamente usada para una nueva etapa de selección. Para la tercera ronda de selección, se tomó un mAB de ratón de un isotipo diferente del que se usó en los dos primeros ciclos de selección, impulsando así el aislamiento de fragmentos de anticuerpo de reacción cruzada (tabla 5). Después de cada etapa de selección, se seleccionaron colonias individuales en ELISA para la producción de fragmento de VHH de reactividad cruzada de IgG de ratón por (tabla 5).

20 Tabla 5

Selección de VHH de reactividad cruzada de la subclase de IgG.			
En la selección se utilizaron α -RR6 (IgG1), α -TAG (IgG2a) y α -Muc (IgG3).			
Biblioteca	Ronda1 [antígeno]=30 nM (enriquecimiento) (% positivo en ELISA)	Ronda 2 [antígeno]=5 nM (% positivo en ELISA)	Ronda 3 [antígeno]=5 nM (% positivo en ELISA)
α -Mab	1. IgG1 (10x) (17)	1A. (29) IgG1	1B. IgG2a (25) 1C. IgG3 (54)
	2. MoFc (8x) (0)	2A. MoFc (0)	2B. HuFc (0)
	3. Blanc	-	-
α -Fc	4. IgG1(8x)(38)	4A. IgG1 17)	4B. IgG2a (13) 4C. IgG3 (0)
	5. MoFc (10x)(0)	5A. MoFc (4)	5B. HuFc (8)
	6. Blanc	-	-

[0130] Los VHH que reaccionan positivamente en los residuos de análisis por ELISA fueron evaluados en BIAcore en cuanto a su unión a fragmentos de Fc humano y de ratón, IgG1 (α -RR6) y IgG2a (α -TAG).

25 [0131] Dos VHH derivados de la biblioteca α -Mab, C4 y G4, y dos VHH derivados de la biblioteca α -Fc, C7 y E7, fueron analizados posteriormente. La elección de estos VHHs se basó en la alta respuesta mostrada en el experimento con BIAcore y en la reactividad cruzada que estos VHH mostraron por unión a dos anticuerpos diferentes o Fcs. Los VHH seleccionados fueron producidos en *E. coli* ambos con y sin marcas y posteriormente purificados.

30 [0132] El análisis de secuencia reveló que los VHH C4 y G4, ambos derivados de la biblioteca α -Mab fueron idénticos. Los dos VHH derivados de la biblioteca α -Fc, C7 y E7, fueron muy similares, pero mostraron algunas diferencias en la secuencia (Figura 2).

35 [0133] Se obtuvieron fragmentos de VHH específicos de IgG de isotipo de ratón con el método de contraselección descrito en el ejemplo 3. Las moléculas de IgG de ratón se pueden dividir en cuatro subclases basadas en las diferencias en las regiones constantes: IgG1, 2a, 2b and 3. Para prevenir la selección de fragmentos de anticuerpos para epítomos en la región variable, que con muy diferentes entre los anticuerpos usados en la selección, se utilizó la biblioteca de α -Fc para la selección de VHH específicos de isotipos de IgG de ratón. Para aumentar la eficiencia de

la selección del VHH específico de subclase, la selección de VHHs de reactividad cruzada fue reducida por la adición de un exceso de veinte veces de IgG diferentes de la subclase de IgG que se seleccionó con (tabla 6).

Tabla 6

Selección de VHH específicos de subclase de IgG.		
En la selección se utilizaron α -RR6 (IgG1), α -TAG (IgG2a) y α -Muc (IgG3)		
Biblioteca	Ronda 1 (5 nM) (contraselección (0,1mM)) (% positivo en ELISA)	Ronda 2 (5nM) (contraselección (0,1mM)) (% positivo en ELISA)
α -Fc	1A. IgG1 (IgG2a + IgG3) (42)	1B. IgG1 (-)
		1C. IgG1 (IgG2a + IgG3) (33)
	2A. IgG2a (IgG1 + IgG3) (50)	2B. IgG2a (-)
		2C. IgG2a (IgG1 + IgG3) (50)
	3A. IgG3 (IgG1 + IgG2a) (33)	3B. IgG3 (-)
		3C. IgG3 (IgG1 + IgG2a) (38)

5 [0134] Se encontraron VHH que específicamente enlazan una subclase de incluso después una única ronda de selección. Se analizaron fragmentos de VHH de la primera y la segunda ronda y que dieron respuestas positivas en los ELISAS en BIAcore como se realizó previamente con los VHH seleccionadas para reactividad cruzada. Se dejó que los Vhh enñazaran a un chip que estaba recubierto con IgG1 (α -Traseolida), IgG2a (α -TAG) y IgG3 (α -Muc).

10 [0135] Los resultados del análisis de BIAcore no están de acuerdo en algunos casos con los resultados obtenidos por selección por ELISA. Todos los VHH fueron seleccionados para unión positiva a antígeno, pero no todos los VHH mostraron esta interacción en BIAcore. Ninguno de los Vhh de α -IgG3 se unió a la IgG3 inmovilizada en el chip de BIAcore. Para la subclase, se seleccionaron dos VHH para mayor análisis. Para aumentar la posibilidad de obtener dos V_{HH}^S diferentes por subclase, se escogieron un VHH que mostró una alta respuesta en BIAcore y un VHH que mostraron una baja respuesta, a partir de los fragmentos específicos de IgG1 y IgG2a. Las diferencias en la composición de aminoácidos podrían responder a las diferencias en comportamiento de estas VHH particulares. Como resultado del hecho de que ninguno de los VHH de α -IgG3 analizados reaccionó positivamente en BIAcore, se eligieron dos VHH positivos de ELISA de forma aleatoria. Los VHH seleccionados fueron producidos con marcas y posteriormente fueron purificados.

20 [0136] Se determinaron las secuencias de seis VHH purificados y de este análisis pareció que VHH C12 y H2 son anticuerpos de bisagra corta, mientras que los demás VHH son de bisagra larga (van der Linden et al., 2000). Las secuencias de aminoácidos se muestran en la figura 3. Los VHH muestran mucha variación en los CDRs, indicando que la estrategia elegida de selección VHH según propiedades de la conducta fue exitosa.8.2.2 Agrupación de anticuerpos

25 [0137] Las IgG de ratón (anticuerpos monoclonales de diferente isotipos) fueron marcados con colorante reactivo (Amersham Pharmacia Biotech) Ci3 o Ci5 según el protocolo del fabricante. Los VHH y las proteínas que sirvieron como control positivo o negativo fueron diluidos en 4 concentraciones diferentes (100, 50, 25 y 12,5 μ g/ml) en PBS y en 1% de BSA (albúmina de suero bovino). Una placa de microtitulación de 96 pocillo se llenó con 50 μ l de cada solución. Cuatro pocillos vacíos fueron rellenados con PBS y cuatro fueron rellenados con 1% de BSA para servir como controles negativos.

30 [0138] Un arrayer GMS 417 (Genetic MicroSystems, Westburg BV) imprimió estas soluciones de proteína sobre portaobjetos de vidrio de microscopio revestidos con amino silano. Los portaobjetos fueron bloqueados durante 1 hora en una solución de Marvel al 3% en PBS, que primero había sido centrifugada para eliminar materia granuloso (10' a 2500 r.p.m.). Los portaobjetos luego fueron lavados en PBST para eliminar pequeñas depósitos de Marvel. Cada matriz fue incubada durante 1 hora con 20 μ l de solución de antígeno (100 μ g/ml), bajo un cubreobjetos. Las matrices fueron lavadas en PBS y luego secadas por aire. Las matrices fueron leídas por un GMS 418 Array Scanner, y los datos resultantes fueron posteriormente analizados por software especializado desarrollado por Genetic MicroSystems.

40 [0139] Para explorar la idoneidad de VHH para aplicaciones de matrices, se construyeron varias copias idénticas de una matriz de anticuerpos de IgG de α -ratón usando cuatro VHH específicos de subclase de IgG seleccionados (B5, C1; G11 y H2) y el VHH E7 de reactividad cruzada de IgG1; IgG2a y IgG3 reactivo de cruce. En la tabla 7 se presenta una lista de VHH S y proteínas que sirvieron como controles negativos y positivos.

Tabla 7

Componentes de una matriz de anticuerpos de IgG de α -ratón	
Nombre	Función
B5	α -IgG2a
C1	α -IgG1
G11	α -IgG3
H2	α -IgG3
E7	α -IgG1
IgG2a-Cy5	Control positivo en la fluorescencia roja
IgG2a-Cy3	Control positivo en la fluorescencia verde
IgG2a-Cy3/Cy5	Control en intensidades relativas de fluorescencia roja y verde
α -AFP	Control negativo
α -GST	Control negativo
Proteína A	Control positivo en concentración de antígenos

[0140] Cada matriz de anticuerpos de α -ratón fue evaluada con diferente(s) antígeno(s) marcado(s) fluorescentemente. Véase la tabla 8 a continuación.

Tabla 8

Antígenos aplicados a las matrices de anticuerpos de α -ratón	
Los antígenos mostrados en cursiva fueron marcados con una marca fluorescente Ci3 y los antígenos marcados con un *) con Ci5..	
N.º de matriz	Antígeno(s)
1	<i>IgG1 / CY3</i>
2	<i>IgG2a / CY3</i>
3	<i>IgG3 / CY3</i>
4	α - <i>MYC / CY3</i>
5	*) <i>IgG1 / *) CY5</i>
6	*) <i>IgG2a / CY5</i>
7	*) <i>IgG3 / CY5</i>
8	*) α - <i>MYC / CY5</i>
9	*) <i>Fc / CY5 de ratón</i>
10	*) <i>suero de ratón / CY5</i>
11	*) <i>IgG1, 2a, 3 / *) CY5</i>
12	*) <i>Fc de ratón / CY5 + IgG1, 2a, 3 / CY3</i>
13	*) <i>Suero de ratón / CY5+ IgG1, 2a, 3 / CY3</i>
14	*) <i>IgG1, 2a, 3 / CY5+ IgG1, 2a, 3 / CY3</i>
15	Blanc CY3

5

Después del escaneado, se obtuvieron diferentes señales positivas de las diferentes matrices (véase la Figura 4).

8.2.3 Eliminación de proteínas abundantes de muestras para análisis de matriz por cromatografía de afinidad con fragmentos de VHH

[0141] Se prepararon extractos de proteína de células con métodos físicos como se describe en los ejemplos 1, 5.1, 6.1 y 7.1. Los métodos bioquímicos se basan en purificación por afinidad de estas proteínas con el dominio variable de anticuerpos de *Camelidae* unidos a un soporte sólido.

5 [0142] Como un ejemplo típico se demuestra la eliminación de albúmina e IgG de suero de ratón por cromatografía por afinidad con VHH. Los fragmentos de anticuerpos que reconocen la albúmina de suero de ratón fueron seleccionados de la biblioteca no inmune. Los VHH que codifica fragmentos de gen fueron reclonados en el vector de expresión de *E. coli* pUR5850, que es idéntico al vector de fagémido pUR5071, pero que carece del gen 3 necesitado para la expresión en el vector de fago. Los VHH fueron expresados con carboxiterminal c-myc- y His6-tag, purificados con TALON (Clontech) y usados para el acoplamiento covalente a un soporte.

10 [0143] Para preparar un soporte de cromatografía con anticuerpo acoplado de manera covalente, se inmovilizaron 12 mg de VHH en 21 ml de tampón (0,1 M de NaHCO₃, 0,5 M de NaCl pH 8,3) a 2 g de Sepharose 4B activado con CNBr (Amersham Biotech) según el protocolo del fabricante. El material de columna (volumen final 7 ml) fue empacado en una columna XK16/20 (Farmacia). Después del tratamiento con tampón de bloqueo (0,1 M de Tris, 0,5 M de NaCl pH 8,0) el soporte de afinidad fue lavado en una forma alternante con suero salino tamponado con fosfato (PBS: 10 mM de Na₂ HPO₄, 150 mM de NaCl pH 7.4) como tampón de equilibrado y PBS con pH ajustado (pH 2.1) como tampón de elución.

20 [0144] Una muestra de suero de ratón (50 µl) fue cargada con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min; en caso de que fuera necesario, la muestra fue reciclada en un bucle cerrado. El material no enlazado fue recuperado y analizado en un gel monodimensional o bidimensional manchado con Coomassie y comparado con una muestra de suero no tratada. Después de una sola ronda de depleción en la columna de VHH se eliminó más del 99% de la albúmina de suero.

25 [0145] La muestra de suero de albúmina reducida fue cargada en una matriz de afinidad con la anti-IgG de ratón (VHH C4 (véase el ejemplo 8.2.1) como se realizó antes (véase más arriba). La fracción no enlazada fue analizada en geles manchados con Coomassie y reveló que se eliminó más del 90% del IgG del suero. En el gel bidimensional se pudieron identificar puntos después de la coloración, que no eran visibles antes de los pasos de depleción, demostrando que la resolución es mejorada.

[0146] La muestra de suero de albúmina reducida fue usada para etiquetar con Ci3 o Ci4 y posteriormente fue analizada en la matriz de anticuerpos (véase el ejemplo 8.2.2). Se obtuvo una relación señal a ruido mucho mejor y una sensibilidad mejorada en comparación con una muestra de suero no reducida.

30 **EJEMPLO 9 - Evaluación de la calidad y la diversidad de la biblioteca de anticuerpos de dominio de de cadena simple por selección con varios antígenos**

[0147] La calidad de la biblioteca fue establecida por una selección con antígenos de diferentes especies. En primer lugar, se evaluó un gran número de antígenos de proteína. Un panel de proteínas humanas, incluidas las interleukinas IL4, IL6 y IL7, inmunoglobulinas, el producto genético PKD1 implicado en la enfermedad renal poliquística humana 1, gen y albúmina de suero humana produjo varios fragmentos de anticuerpo de dominios único específico y se seleccionó una serie de fragmentos de VHH anti-idiotípico contra un anticuerpo anti-hCD4 humanizado de origen humano, lo que permitió la cuantificación del anticuerpo anti-CD4 en suero humano hasta una concentración de 0,5 nM. Un segundo grupo consistió en proteínas de origen eucariota no humano, incluida la IgG de ratón y cerdo. Un tercer grupo consistió en diferentes organismos, incluidos *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* y el antígeno de superficie de BabA de *Helicobacter pylori*. Nuevamente, los fragmentos obtenidos podrían utilizarse para la detección específica de las bacterias, incluso en presencia de altas concentraciones de detergentes. Un cuarto grupo consistió en proteínas de bacteriófagos y virus, incluidos lisina de fago p2 de *Lactococcus lactis* y el sobre del virus de la enfermedad del páncreas de salmón (SPDV). Un quinto grupo consistió en moléculas receptoras, incluido el dominio extracelular del receptor de glutamato humano (mGLU4R) y un bucle extracelular de la bomba de fármaco pdr12 de levadura. Un sexto grupo consistió en proteínas y modificaciones post-traduccionales de las mismas, de levaduras.

[0148] En segundo lugar, la biblioteca contenía anticuerpos contra si mismos. Como el fragmento de VHH objetivo sin marcas (myc y His6) produjo anticuerpos específicos, que enlazan éstos y moléculas relacionadas probablemente reconociendo un epítipo en el extremo C- terminal libre, que es codificado por la región FR4.

50 [0149] En tercer lugar, se utilizó un grupo de haptenos para la selección, que en general no suscita anticuerpos de cadena pesada al momento de la inmunización de llamas o camellos. Los haptenos evaluados fueron la 3 glucuronida de estrona de hormona (E3G), que produjo fragmentos reactivación cruzada contra estradiol, y también VHH específicos de estrona. Además, los fragmentos de anticuerpos fueron seleccionados contra 5-(2'.3'.5'.6'-tetracloro-4'-oxifenil) ácido valérico y la molécula relacionada 5-(2'.3'.5'.6'-tetracloro-4'- metoxifenil) ácido valérico, el azocolorante Reactive Red y contra fitoestrógeno.

55

Listado de secuencias

[0150]

- <110> UNILEVER N.V./Unilever PLC
- <120> PROTEIN ARRAYS
- 5 <130> T3083(V)
- <160> 4
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 23
- 10 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial:cebador PCR
- <400> 1
- 15 gaggtbcarc tgcaggastc ygg 23
- <210> 2
- <211> 53
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial:cebador PCR
- <400> 2
- aacagttaag ctccgcttg cggccgcgga gctgggtct tcgctgtgt gcg 53
- <210> 3
- 25 <211> 53
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial:cebador PCR
- 30 <400> 3
- aacagttaag ctccgcttg cggccgctgg ttgtggttt ggtgtcttg gtt 53
- <210> 4
- <211> 32
- <212> PRT
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial:multi-marca fundida a terminal de carboxi VHH

ES 2 368 623 T3

<400>

4

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala Leu Arg
1 5 10 15
Ser Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His His His His His His
20 25 30

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una matriz de proteína que comprende una pluralidad de dominios variables de cadena pesada derivados de una inmunoglobulina que está naturalmente desprovista de cadenas ligeras (dominio VHH) obtenible de Camelidae, y donde los dominios variables de cadena pesada se derivatizan con un grupo químico a través del cual los dominios variables de cadena pesada se acoplan a la matriz, o donde los dominios variables de cadena pesada se acoplan a la matriz a través de una extensión peptídica,
- 10 con la condición de que los dominios variables de cadena pesada no sean acoplados de manera covalente a la matriz por un segmento de polipéptido que es capaz de adoptar una estructura plegada separada a partir de la estructura plegada del resto de los dominios variables de cadena pesada, conteniendo el segmento de polipéptido al menos un residuo reticulable para unión covalente a una superficie sólida y donde el segmento de polipéptido tiene la estructura genérica AZB donde A y B son regiones de secuencia peptídica que pueden unirse para formar una estructura, y Z es una región de secuencia peptídica capaz de formar un lazo.
- 15 **2.** Matriz de proteínas según la reivindicación 1 que comprende dominios variables de cadena pesada a partir de una biblioteca que comprende secuencias de ADN clonadas que codifican dominios variables de cadena pesada, caracterizada por el hecho de que los clones se derivan de un animal no inmunizado del género Camelidae.
- 3.** Matriz de proteínas según la reivindicación 1 o 2, que comprende además:
- (a) una superficie sólida;
- (b) una pluralidad de dominios variable de cadena pesada inmovilizados en posiciones diferentes en la superficie sólida, caracterizada por el hecho de que cada dominio variable de cadena pesada es capaz de unirse a un antígeno de proteína específica.
- 20 **4.** Matriz de proteínas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por el hecho de que los dominios variables de cadena pesada han sido derivados por selección de una biblioteca que usa el método de expresión de fago o de eucariota inferior.
- 25 **5.** Matriz de proteínas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por el hecho de que los dominios variables de cadena pesada han sido inmovilizados por unión química por medio de extensiones de péptido N- o C- terminales de los dominios variables de cadena pesada.
- 6.** Matriz de proteínas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que los dominios variables de cadena pesada se biotinilan y se acoplan a la matriz con una superficie derivatizada con estreptavidina.

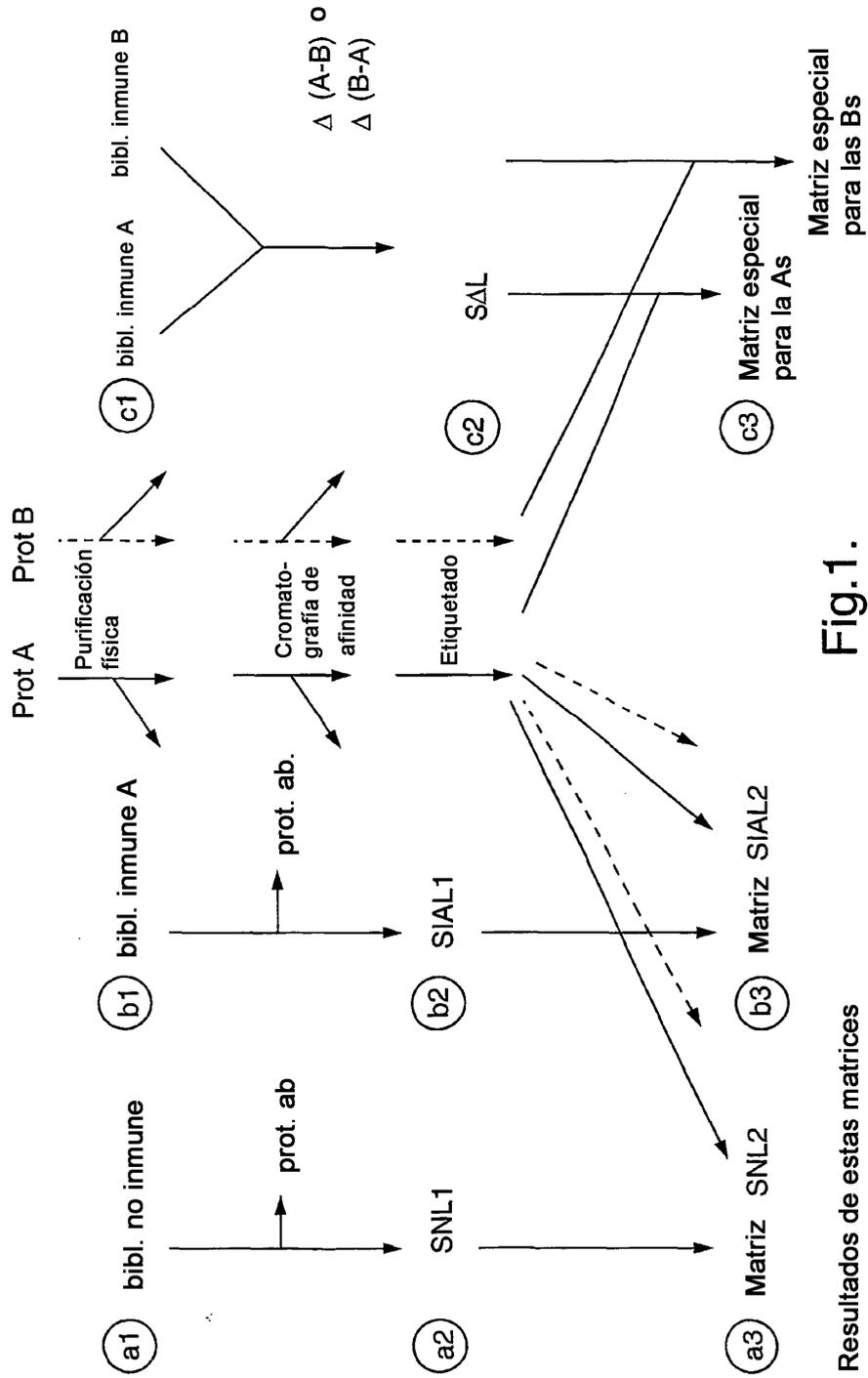


Fig.1.

Fig.2.

```

FR1                CDR1                FR2
1                10                20                30                40
C4 QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAISGRITYM SLAMG WFRQAQGGKREFVS
G4 -----
C7 -----P-----A----FS NYV-- -----P-----IA
E7 -----D-----A-G-----V----DS NYV-- -S---P-----IA

CDR2                FR3
50 2A                60                70                80 2ABC                90
C4 AISWSGKKTLYADSVK GRFTISIDNAKNMVFLQMNSLTPEDTAVYYCAA
G4 -----
C7 --D-D-GG-H-----R -----R-S-----Y----G-K-----R--H
E7 --H-SEGG-H-----K D----FR-S---IMY----G-K-----H--H

CDR3                FR4                HINGE
100ABCDEFGHI                110                120
C4 DENLPFDPETGLYGYDY WGQGTQVAVSS EPKTPKPQP
G4 -----
C7 NSGTGSF.....-- -----T--- -----
E7 NSGTGAF.....-- -----T--- -----

```

Fig.3.

	FR1	CDR1	FR2
	1	25	
C1 (IgG1)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRVSCAASGRTP T	WILMG	WFRQAPGKERE FVA
C12 (IgG3)	-----D-----E-----L-----V-----SS	TYAM-	-----
B5 (IgG2A)	-----E-----V--P-----L-----A-KSIFG	FGAV-	H-----Q--L--
H2 (IgG1)	-----E-----V--P-----L-----AFGFTLD	QHAI-	F--S--NE--A-S
C6 (IgG2B)	-----E-----V--P-----L-----ASGFDFS	TYWY	-V--A--KGL-W-A
G11 (IgG3)	-----D-----V-A-----L-----ASGRPFS	NYAVG	-F--A--KER-F-A
	50	75	
	CDR2	FR3	
C1 (IgG1)	SIIWSTGTTFFYADSVK	GRFSISKDNGANTQILQMNLSLKPEDTAVYYCAA	
C12 (IgG3)	A-S--G-SIH-----	---TI-R--AKS-V-----	-----G
B5 (IgG2A)	R-TYDS-T.N-----	---TI-R--AKN-V-----	-----G--NA
H2 (IgG1)	C-NAND-AIY-----	---TL-R--DKN-VD-----	-----SD--AA
C6 (IgG2B)	T.DKTY-VTY-----	---TI-R--AKR-LY-----	-----SD--A--AR
G11 (IgG3)	AISRIL-NTY-T-----	---TI-R--AKS-VY-----	-----NPE--A--AA
	100		
	CDR3	FR4	HINGE
C1 (IgG1)	S..RAYTG...GYVRTIDFDS	WGRGTQVTVSS	EPKTPKPQP
C12 (IgG3)	N.FAAWVGRNNAYIRGDEYNY	--Q-A-----	AHHSIEDPSS
B5 (IgG2A)	ETVRATTGRFI.....TDL	--Q-T-----	EPKTPKPQP
H2 (IgG1)	NSGR.YCARIG.....YDY	--Q-T-----	AHHSIEDPSS
C6 (IgG2B)	DQSGAD.....	R-Q-T-----	EPKTPKPQP
G11 (IgG3)	RLDFNPSYSKS.....DYDY	--Q-T-----	EPKTPKPQP

Fig.4.

