

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 163**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2005 E 05745259 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1743037**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de moléculas específicas que se unen de manera altamente selectiva a moléculas diana seleccionadas**

30 Prioridad:

**30.04.2004 DE 102004021707**

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

**05.03.2013**

73 Titular/es:

**CYTOTOOLS GMBH (100.0%)  
Klappacher Strasse 126  
64285 Darmstadt , DE**

72 Inventor/es:

**KLOCK, GERD;  
KAISER, DIRK y  
FREYBERG, MARK, ANDRE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 397 163 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

Procedimiento para el aislamiento de moléculas específicas que se unen de manera altamente selectiva a moléculas diana seleccionadas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de moléculas específicas, que se unen de manera altamente selectiva a moléculas diana seleccionadas.

Para la identificación de moléculas bioquímicas tales como, por ejemplo, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos o sustancias químico-sintéticas, que deben ser desarrolladas para fines diagnósticos o terapéuticos, hoy día se encuentran a disposición una serie de procedimientos. En este caso, la investigación moderna, con el fin de encontrar principios activos, se ha concentrado ampliamente en la utilización de bibliotecas moleculares. En esas bibliotecas, las biomoléculas se ponen a disposición en parte en gran número, es decir entre  $10^9$  y  $10^{15}$  de diferentes especies. Estas bibliotecas pueden ser examinadas de manera óptima mediante diferentes procedimientos de cribado de alto rendimiento (Lenz, G.R. et al. (2000) Drug Discovery Today **5**(4) 145-156; Jayasena, S.D. (1999), Clin. Chem. **45**(9): 1628-1650; Khandurina, J. y A. Guttman (2002). Curr. Opin. Chem. Biol. **6**(3), 359-366).

15 Estos métodos relativamente nuevos se utilizaron ya en el ámbito preliminar de la búsqueda de principios activos, por ejemplo para la caracterización funcional de proteínas de nuevo descubrimiento, incluida la identificación de sus paticipes de unión (MacBeath, G. y S.L. Schreiber (2000) Science **289**(5485, 1760-1763). Se utilizan sobretodo procedimientos de rastreo con ayuda de bibliotecas moleculares para encontrar principios activos que se identifican por la unión a proteínas diana (moléculas diana). En este caso, existen bibliotecas para macromoléculas, tales como péptidos o ácidos nucleicos (aptámeros) y bibliotecas combinatorias de moléculas orgánicas más pequeñas (Azriel-Rosenfeld, R. et al. (2004) J. Mol. Biol. **335**(1):177-192; Jayasena, S.D. (1999), Clin. Chem. **45**(9): 1628-1650; Khandurina, J. y A. Guttman (2002). Curr. Opin. Chem. Biol. **6**(3), 359-366) (MacBeath, G. y S.L. Schreiber (2000) Science **289**(5485, 1760-1763)

25 En un gran número de enfermedades juegan un papel central las células endoteliales y las células inmunológicas y están frecuentemente involucradas en la causa de su aparición. En este caso, juegan un papel muy decisivo las moléculas de membrana existentes muy frecuentemente sobre la superficie de las células, cuya función es activada por ligandos específicos. A continuación, a modo representativo de ellas se citan solamente algunos pocos ejemplos:

- a) **Asma:** en el caso de asma se observa una activación celular y la inducción a inflamaciones por determinadas interleuquinas (Doucet, C.; D. Brouty-Boye, et al. (1998) J. Clin. Invest. **101**(10): 2129-2139; Larche, M., D.S. Robinson, et al. (2003) J. Allergy Clin. Immunol. **111**(3): 450-463.
- 30 b) **Mucoviscidosis** (fibrosis cística): la inflamación crónica de las vías respiratorias se refuerza por factores estimulantes (Dudez, T. S., M. Chanson, et al. (2002) J. Infect. Dis. **186**(6): 774-781).
- c) **Enfermedad pulmonar fibrótica:** reacciones inflamatorias sostenidas conducen a la liberación de factores del crecimiento, los cuales desencadenan una partición celular incrementada (Krein, P. M. y B. W. Winston (2002) Chest **122**(6supl): 289S-293S.
- 35 d) **Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa:** en las dos enfermedades intestinales determinadas citoquinas fomentan los procesos inflamatorios por unión de sus receptores a la superficie celular (Schmidt, C., T. Marth, et al. (2002) Phatobiology **70**(3): 177-83; Murakami, H., S. M. Akbar, et al. (2002) Clin. Exp. Immunol. **128**(3): 504-510).
- 40 e) **Aterotrombosis en pacientes diabéticos:** la diabetes representa un riesgo para la aterotrombosis y otras enfermedades vasculares, en donde los marcadores inflamatorios sobre células inmunológicas y factores de adhesión juegan un papel en cuanto a su origen (Berliner, S., O. Rogowski, et al. (2000) Cardiology **94**(1): 19-25; Schram, M. T., N. Chaturvedi, et al. (2003) Diabetes Care **26**(7), 2165-2173).
- 45 f) **Artritis reumática:** la enfermedad se considera como inflamación crónica, en la que factores inmunoestimulantes e inhibidores han perdido el equilibrio (Feldmann, M., et al. (1996) Cell **85**(3): 307-310; den Broeder, A. A. et al. (2002) Ann. Rheum. Dis **61**(4): 311-318).
- g) **Cáncer:** procesos tales como crecimiento celular, angiogénesis y metastación de tumores requieren la interacción de receptores de membrana de la célula tumoral con ligandos específicos (Baselga J. (2001) Eur. J. Cancer **37** supl. 4: pág. 16- pág. 22; Ribatti, D., A. Vacca, et al. (2002) Eur. J. Cancer **38**(6): 750-757; Pecheur, I., O. Peyruchaud, et al. (2002) Faseb J. **16**(10): 1266-1268).
- 50 h) **Arteriosclerosis:** en la aparición de arteriosclerosis juegan un decisivo papel un gran número de receptores de membrana (Freyberg, M. A., D. Kaiser, et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. **286**(1); 141-149; Lentsch, A. B. y P. A. Ward (2000) J. Pathol. **190**(3): 343-348; Parker, C., 3rd, J. A. Vita, et al. (2001). Atherosclerosis **156**(2): 417-424; Xu, Q. (2002) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **22**(10): 1547-1559.
- 55 i) **Alzheimer:** en pacientes de Alzheimer la proteína beta-amiloide puede desencadenar una inmunoreacción en el cerebro, que influye en el transcurso de la enfermedad (Giri, R., Y. Shen, et al.

(2000) Am J. Physiol. Cell Physiol. **279**(6): C1772-81; Johnstone, M., A. J. Gearing, et al. (1999) J. Neuroimmunol. **93**(1-2): 182-193).

Hoy en día, muchas de estas enfermedades aún no son curables o sólo lo son muy difícilmente. En un gran número de los casos esto se debe a que, a pesar de las bibliotecas de sustancias mencionadas anteriormente, los procedimientos de rastreo más rápidos y más sensibles, así como de moléculas obtenibles de modo recombinante, por lo regular no consiguieron aislar moléculas de unión que bajo condiciones *in vivo* presentaran una elevada efectividad, respectivamente una fuerte unión a la molécula diana seleccionada.

Por lo tanto, en el sector del ramo sigue existiendo una elevada necesidad de desarrollar principios activos para moléculas diana medicinalmente relevantes, proporcionándose en la mayoría de los casos el efecto medicinal por unión del principio activo a la molécula diana medicinalmente relevante.

Especialmente, se ha puesto de manifiesto, que con los procedimientos de cribado realizados por el momento en el estado actual de la técnica sólo raras veces, y sólo con grandes dificultades, se consigue aislar buenas moléculas de unión para moléculas de membrana celular, nativas. Particularmente, hay que destacar aquí el involucrar la superficie celular en el desarrollo de principios activos, puesto que con ayuda de los procedimientos obtenidos hasta ahora, si acaso, se pudieron aislar predominantemente ligandos contra proteínas intracelulares o proteínas solubles extracelulares.

Aquí, entre otras cosas, es problemática la gran complejidad necesaria para el aislamiento de las moléculas diana, así como el hecho de que en el caso del procedimiento de rastreo, las proteínas de membrana aisladas se presentan posiblemente con una estructura modificada. Entonces, ésta no correspondería ya la situación *in vivo* y, por tanto, las moléculas de unión aisladas presentarían *in vivo* un efecto reducido – si acaso existente - frente a la situación experimental.

Procedimientos de selección en células de mamíferos, publicados hasta el momento en el estado actual de la técnica (Arap, W., M. G. Kolonin, et al. (2002) Nat. Med. **8**(2): 121-127; Blank, M., T. Weinschenk, et al (2001) J. Biol. Chem. **276**(19): 16464-16468; Daniels, D., H. Chen, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU **100**(26): 15416-15421) se llevaron a cabo con el objetivo de obtener primeramente un amplio espectro de moléculas ligantes (aptámeros, péptidos) que deberían cubrir como dianas (targets) en la mayor parte posible las proteínas de superficie de las células diana, por ejemplo de una célula tumoral. En todo caso, aún se tenía aquí la opción de llevar a cabo en el transcurso del procedimiento, o a continuación, una contra-selección con una célula control, para, como en el caso de la célula tumoral como objetivo, captar en ésta a ser posible muchas moléculas de unión de la célula control (aquí: no célula tumoral), para así eliminarlas. A continuación, había que buscar con gran complejidad la proteína diana correspondiente a cada molécula de unión obtenida individualmente. Puesto que hoy en día ya se conocen muchas proteínas diana que se consideran medicinalmente relevantes, estos procedimientos para encontrar principios activos contra proteínas ya conocidas son en general demasiado complejos. La posibilidad de aplicación de una biblioteca química-sintética completa (grupo individual) se limita hasta ahora prácticamente sólo a un principio técnico: la unión específica a dianas interesantes se limita a proteínas líquidas, las cuales sólo después de su expresión y purificación pueden ser ofrecidas a las moléculas sintéticas como partícipes de unión.

Hasta el momento, los principios activos solo pueden ser identificados en células vivas como sustancias individuales, pero no en el grupo, es decir que precisamente aquí los ensayos de unión sólo son posibles como ensayos puramente analíticos en forma de numerosos ensayos individuales. Lo mismo vale para los ensayos funcionales en células en donde, por ejemplo la modulación de las funciones celulares tales como la partición celular o la admisión de determinadas sustancias en la célula, se lleva a cabo con gran complejidad con cada sustancia individual, es decir sólo en forma analítica, pero no como procedimiento de selección preparativo a partir de un grupo de sustancias. Por lo tanto, como en otros procedimientos para la identificación de sustancias a partir de bibliotecas de sustancias (bibliotecas de anticuerpos, de expresión en fagos, de péptidos y de ácidos nucleicos (bibliotecas de aptámeros), no existen tampoco por el momento en las bibliotecas de sustancias químico-sintéticas consideradas futuribles, procedimiento alguno que se pueda aplicar al gran número de potenciales proteínas diana sobre superficies celulares, generalmente receptores en membranas celulares.

Por lo tanto, según el estado actual de la técnica existe una gran necesidad de procedimientos mejorados, con cuya ayuda un gran número de proteínas de membrana, que participan en la aparición de enfermedades, se puedan hacer accesibles a los modernos métodos de desarrollo de principios activos.

Objeto de la presente invención era por tanto desarrollar un procedimiento con el cual se pudieran preparar, respectivamente aislar, moléculas de unión específicas contra a moléculas diana nativas, seleccionadas. El procedimiento debería hacer posible especialmente el poder aislar moléculas de unión contra moléculas diana nativas, seleccionadas, de manera altamente selectiva, es decir que apunte específicamente a una única molécula diana, excluyendo un máximo de moléculas no específicamente ligantes, sin aislamiento de la molécula diana, incluyendo aquellas moléculas diana con bajo número de copias y aquellas que, por ejemplo después de la unión de ligandos, se puedan internalizar por endocitosis.

Otros objetos de la invención resultan de la discusión del estado de la técnica, precedente.

La solución del problema conforme a la invención se expone en la reivindicación 1. Ejemplos de ejecución preferidos se ilustran con más detalle en las reivindicaciones dependientes.

Por el hecho de que

- 5 a) se prepara una biblioteca de sustancias que contiene potenciales moléculas de unión, y se pone en contacto con las moléculas diana,
- b) se añade un competidor de unión no específico,
- c) al menos una vez se lleva a cabo un proceso de lavado,
- 10 d) se añade e incuba en la biblioteca de sustancias un competidor de unión específico para la molécula diana seleccionada, en una concentración que es al menos aproximadamente 10 veces, preferentemente al menos aproximadamente 100 veces, de modo particularmente preferido al menos aproximadamente 1000 veces superior a la constante de disociación  $K_D$  (M) de la pareja de competidor de unión específico y molécula diana, y
- e) las moléculas de unión específicas, ahora desprendidas, se aíslan mediante un procedimiento adecuado para la biblioteca de sustancias, y/o eventualmente se amplifican,

15 se consigue de manera asombrosamente sencilla solucionar el problema anteriormente citado.

Bajo un punto de vista preferido, la biblioteca de sustancias es una biblioteca de sustancias amplificable, seleccionada del grupo que se compone de: bibliotecas de ácidos nucleicos, bibliotecas de expresión en fagos, bibliotecas de anticuerpos, bibliotecas de péptidos o una biblioteca químico-sintética, como son bien conocidas en el sector del ramo, y que se pueden preparar fácilmente por los métodos publicados en el sector del ramo.

20 Eventualmente, una biblioteca de sustancias de este tipo también se puede comprar.

En principio, puesto que el procedimiento conforme a la invención se puede llevar a cabo tanto para bibliotecas de sustancias amplificables como también no amplificables, en la etapa

25 a) se pueden emplear diferentes bibliotecas. Estas se pueden adquirir comercialmente o se pueden preparar fácilmente antes de llevar a cabo el proceso de selección con ayuda de métodos bien conocidos en el estado actual de la técnica.

Bajo otro punto de vista preferido, las etapas a) y b) del procedimiento indicado anteriormente se llevan a cabo al mismo tiempo.

30 Bajo otro punto de vista preferido, el competidor no específico se selecciona del grupo constituido por: leche en polvo, proteínas séricas tales como albúmina sérica o ácidos nucleicos tales como tARN o ARN de levadura, eritrocitos, fantasmas de eritrocitos (envolventes de membrana), líneas celulares de origen hematopoyético tales como células de linfoma o células leucémicas, o células HeLa en suspensión, así como orgánulos celulares tales como núcleos celulares o mitocondrias, no portando las células, las membranas celulares o los orgánulos la molécula diana, son preferidos en este caso los eritrocitos, los fantasmas de eritrocitos (envolventes de membrana), las líneas celulares de origen hematopoyético tales como células de linfoma o células leucémicas, o células HeLa en suspensión, así como los orgánulos celulares tales como núcleos celulares o mitocondrias, no portando las células, las membranas celulares u los orgánulos la molécula diana.

35

De forma muy preferida, en el caso del competidor no específico se trata de eritrocitos y/o fantasmas de eritrocitos (envolventes de membrana) que no portan la molécula diana.

40 Bajo otro punto de vista preferido, las etapas a) hasta e) se llevan a cabo varias veces, sin embargo preferentemente no más de tres a cinco veces sucesivas, introduciéndose a partir de la segunda ronda las moléculas de unión obtenidas en la etapa e) en la etapa a), en lugar de la biblioteca amplificable.

45 Bajo otro punto de vista preferido, en el caso de la biblioteca se trata de una biblioteca de aptámeros. Métodos para la preparación de una biblioteca de este tipo son bien conocidos y se remiten generalmente al documento US 5, 475, 096, en donde se dan a conocer los métodos correspondientes. Estos métodos se continuaron desarrollando y están a disposición del experto en la materia en un enorme número de variantes.

Bajo otro punto de vista preferido las moléculas diana en la etapa a) del procedimiento conforme a la invención se encuentran en forma nativa, especialmente en unión de una biomembrana, preferentemente sobre la superficie de una membrana celular, de modo especialmente preferido sobre células intactas.

50 Bajo otro punto de vista preferido, en la etapa a) se añade un inhibidor de endocitosis en cantidad suficiente para inhibir la endocitosis, preferentemente citocalasina B, en una cantidad de 1 a 10  $\mu\text{M}$ .

Bajo otro punto de vista preferido, la molécula diana seleccionada es una molécula que se encuentra permanentemente en la membrana, de la cual se conoce también una forma soluble, y en la etapa a) se añade un inhibidor de la proteinasa.

Bajo otro punto de vista preferido, el competidor de unión específico se selecciona del grupo constituido por anticuerpos y sus fragmentos, aptámeros, ligandos de la molécula diana, así como competidores de bajo peso molecular.

5 De modo especialmente preferido se trata aquí de ligandos de moléculas de superficie celulares, interesantes clínica o diagnósticamente o de cualquier otro modo, siendo particularmente preferido IAP ó  $\alpha\beta 3$ .

10 Es especialmente ventajoso que con el procedimiento conforme a la invención se pueden preparar precisamente aquellas moléculas de unión que perturban específicamente la interacción entre ligando y molécula diana y, con ello, con una probabilidad fuertemente incrementada frente a los procedimientos conocidos del estado de la técnica, ligandos funcionales, es decir aquellos que imitan o inhiben la interacción de, por ejemplo ligandos naturales, con la molécula diana. De esta manera se consigue preparar de modo asombrosamente rápido y sencillo moléculas de unión biológicamente activas y, por tanto, principios activos potencialmente eficaces.

Bajo otro punto de vista preferido, la presente invención se refiere a un equipo (kit) que comprende al menos un competidor de unión no específico y un inhibidor de la endocitosis y/o un inhibidor de proteasas.

El equipo puede comprender, además, una biblioteca de sustancias amplificable.

15 Además, la presente invención se refiere también a las moléculas de unión, que fueron aisladas con ayuda del procedimiento conforme a la invención, así como a su utilización, por ejemplo, en terapia o diagnosis.

Bajo una biblioteca de sustancias amplificable, para los fines de la presente invención se selecciona ventajosamente una biblioteca seleccionada del grupo constituido por bibliotecas de ácidos nucleicos, bibliotecas de expresión en fagos, bibliotecas de anticuerpos o bibliotecas químico-sintéticas.

20 Por lo tanto, como "moléculas de unión específicas" se entienden, conforme a la invención, aquellas moléculas que son objeto de las numerosas bibliotecas ya realizadas en el estado actual de la técnica. A ellas pertenecen, por ejemplo aptámeros, anticuerpos y sus fragmentos, péptidos, anticalinas y moléculas sintetizadas químicamente.

A partir del tipo de biblioteca de sustancias seleccionado y preparado se obtiene también en este caso, sin esfuerzo, la potencial molécula de unión que se ha de aislar de ésta.

25 El competidor de unión específico, el cual posee afinidad para la proteína diana, se selecciona ventajosamente del grupo constituido por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, aptámeros de ADN y de ARN, compuestos de bajo peso molecular y otros, por ejemplo ligandos de la proteína diana existentes de forma natural.

30 Este competidor de unión específico se emplea en función de su afinidad para la molécula diana, en una concentración de al menos  $1\mu\text{M}$ , preferentemente de al menos  $10\mu\text{M}$ , de modo particularmente preferido de al menos  $100\mu\text{M}$ , de modo muy particular de al menos  $1\text{mM}$  y máximamente preferido de al menos  $10\text{mM}$ . Sin embargo, es obvio que esta concentración tiene que tener un límite superior en razón de la disponibilidad y/o solubilidad del competidor de unión específico, el cual puede ser determinado en cada caso con gran facilidad por el experto en la materia.

35 En este caso, el experto en la materia, en el marco de las posibilidades experimentales, va a preferir una concentración del competidor de unión específico lo más alta posible. Naturalmente, sobre la afinidad de la potencial molécula de unión específica de la biblioteca de sustancias, antes de llevar a cabo el experimento, no hay nada conocido. En general, se deben aislar preferentemente ligandos fuertes, de manera que es deseable una concentración lo más alta posible del competidor de unión específico

40 Si se conoce o al menos se puede estimar la constante de unión del competidor específico para la molécula diana, entonces la concentración del competidor de unión es al menos aproximadamente 10 veces, preferentemente al menos aproximadamente 100 veces, de modo particularmente preferido al menos aproximadamente 1000 veces superior que el valor de la constante de unión ( $K_D$ ) conocida o determinada o estimada.

45 Valores conocidos de constantes de unión ( $K_D$ ) de la unión de anticuerpos, respectivamente de fragmentos de anticuerpos, a proteínas son por ejemplo  $10^{-10}$  hasta  $10^{-8}$  M (Hornick, J. L.; J. Sharifi, et al. (2000) J. Nucl. Med. **41**(2): 355-362; Nielsen, L. S.; J. G. Hansen, et al. (1983) Embo. J. **2**(1): 115-119; Zhou, Y. H., M. Takekoshi, et al. (2002) Antiviral. Res. **56**(1): 51-59), para aptámeros  $10^{-9}$  hasta  $10^{-7}$  M (Rhodes, A., A. Deakin, et al. (2000) J. Biol. Chem. **275**(37): 28555-28561; Martell, R. E., J. R. Nevins, et al. (2002) Mol. Ther. **6**(1): 30-34) y, respectivamente para péptidos,  $10^{-5}$  hasta  $10^{-8}$  M (Lamla, T. y V. A. Erdmann (2003) J. Mol. Biol. **329**(2): 381-388; Nord, K., O. Nord, et al. (2001) Eur. J. Biochem. **268**(15): 4269-4277).

50 Bajo un ejemplo de ejecución particularmente preferido, la presente invención se refiere además a un equipo de partes, el cual comprende al menos un competidor de unión no específico, así como un competidor de unión específico, comprendiendo, además, de modo particularmente preferido, una biblioteca de sustancias amplificable.

55 Con el procedimiento de selección conforme a la invención se pueden seleccionar, en principio, moléculas terapéutica o diagnósticamente funcionales contra todas las moléculas diana biológicas sobre superficies celulares, dando por supuesto que ya se dispone de un ligando específico, anticuerpo u otra molécula de unión para la molécula diana.

Sorprendentemente se ha puesto de manifiesto, que con el procedimiento conforme a la invención ya después de aproximadamente 5 rondas de selección se encontraron ligandos específicos. En el estado actual de la técnica, en otros procedimientos, a saber en el denominado procedimiento SELEX, para la identificación de ácidos nucleicos ligandos de un grupo de aproximadamente  $10^{14}$  y más moléculas, fueron necesarias hasta ahora un número de rondas de selección sensiblemente superior. Conforme a la invención, la selección no se prolongó ciertamente durante tanto tiempo como en el procedimiento SELEX, hasta encontrar familias de moléculas, para lo cual se necesita regularmente al menos ocho a diez rondas de selección. Por el contrario, conforme a la invención, después de conseguir una afinidad en el grupo de selección aparentemente superior, lo cual sorprendentemente ya era el caso después de aproximadamente cinco rondas de selección, la afinidad de algunas moléculas para la molécula de unión se determinó con el mismo procedimiento que en la selección preparativa. Por esta forma de proceder se excluye que, después de demasiadas rondas de selección, se seleccione un pequeño grupo de moléculas diana (respectivamente moléculas que se unen a éstas), que no representa el espectro total de potenciales moléculas diana, o una gran parte de él. A diferencia con el procedimiento SELEX, en el caso de ácidos nucleicos esta forma de proceder (sin extensa búsqueda de familias de moléculas) es también importante, dado que muchas moléculas diana se encuentran en un considerable defecto molecular, de varias potencias de diez, frente a todas las demás moléculas diana: una proteína de membrana con un número de copias de 10.000 por célula no sólo se selecciona frente a varios cientos o pocos miles de otras especies de moléculas de la respectiva superficie celular, sino que con esta molécula diana aún se debe poder seleccionar de forma eficiente, en competencia con otras muchas moléculas diana con un mayor número de copias (desde algunas diez mil hasta menos de cien mil por célula); de ello resulta, en el caso menos favorable, un exceso molecular de aproximadamente  $10^4$  hasta  $10^5$  de moléculas no deseadas frente a la molécula deseada (como molécula diana).

Conforme a la invención, en el caso de proteínas como molécula diana, la selección se lleva a cabo preferentemente no con la proteína diana aislada, sino con células intactas o con membranas celulares, en donde una membrana celular intacta incluye también conforme a la invención una membrana que se prepara después de abrir la célula, por ejemplo por sucesiva congelación y descongelación de las células. Por esta manera de proceder no se corre el riesgo de ninguna modificación estructural por expresión artificial, por ejemplo en bacterias, ni en la purificación de la proteína diana. Por ello se consigue, además, que la proteína se encuentre aún formando un complejo con otras proteínas.

Si en células vivas o respectivamente sobre su superficie se emprende una selección con bibliotecas de moléculas, no se puede excluir que a temperaturas superiores a  $4^{\circ}\text{C}$  no tenga lugar una endocitosis de la respectiva proteína de membrana, que precisamente se está ligando como molécula diana. La endocitosis se puede desencadenar también por la unión de la respectiva molécula, respectivamente del bacteriófago, si en este caso se imita la interacción con un ligando. Aún cuando la tasa porcentual de las proteínas que se internalizan es baja, se va a sumar sin embargo durante todo el espacio de tiempo a la respectiva selección, de manera que, por ejemplo, aproximadamente tres horas después de la unión inicial de los participantes de unión de la biblioteca de moléculas y subsiguiente lavado o, respectivamente, elución, sólo queda remanente una parte porcentual muy pequeña, es decir existente en forma de complejo en la superficie celular. Por ello, esto es importante porque, a diferencia de otros procedimientos, las moléculas, respectivamente partículas aún ligadas se pueden recuperar, no por apertura celular y subsiguiente aislamiento, sino por liberación de la superficie. Para eludir este problema, en el caso de utilizar células vivas se añade un inhibidor de la endocitosis, por ejemplo citocalasina B.

Los ligandos unidos a la superficie de células se pueden perder también por liberación proteolítica (Hummel, V., B. A. Kalimann, et al. (2001) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**(4): 320-327) de las proteínas a las que están unidas: así, adicionalmente a las proteínas situadas sobre la membrana de la familia de selección o de la molécula de adhesión celular ("cell adhesion molecule" familia-(CAM) (ICAM, VCAM) existen las respectivas proteínas solubles (sICAM, cVCAM), las cuales, por ejemplo, también se pueden detectar en la sangre (Mukae, H., J. Ashitani, et al. (2003) *Respirology* **8**(3): 326-331. Para evitar la pérdida de moléculas ligadas, en el caso de la selección se pueden añadir a las respectivas soluciones de unión y de lavado los correspondientes inhibidores de proteasas contra proteínas de membrana de esta clase.

Conforme a la invención se establece con ello un procedimiento, en el cual se hace posible acceder i) a moléculas de superficie sobre células de mamíferos, membranas celulares y membranas, ii) a superficies de orgánulos o membranas celulares, iii) a células, en las cuales la molécula diana, eventualmente junto con otras moléculas diana, se expresó como molécula de membrana, iv) y a moléculas como parte integrante de una matriz extracelular, como moléculas diana para el desarrollo de un principio activo con ayuda de bibliotecas de moléculas. Esto tiene lugar por unión a la célula, al orgánulo, a la membrana o matriz extracelular en presencia de determinados aditivos, separación por lavado de moléculas, respectivamente de partículas, no unidas o débilmente unidas, y desprendimiento de las que aún están unidas por competición con un ligando conocido, en exceso, por ejemplo un anticuerpo. A continuación puede tener lugar o bien (a) directamente el análisis, respectivamente identificación de las moléculas unidas; o (b) el análisis y la caracterización sigue a las etapas de aislamiento y amplificación (por ejemplo por clonación) de las moléculas unidas; o (c) el procedimiento se repite una o varias veces, empleándose la mezcla de las moléculas unidas directamente o después de la amplificación, para la unión. En este caso, (caso "c") después de la amplificación (in vitro o in vivo) se determina la cantidad unida de la última selección, se estima a partir de ella la afinidad relativa de la correspondiente ronda de selección y se repite todo el proceso de selección. Si se observa una unión incrementada después de al menos tres a cinco rondas, se aíslan algunas moléculas de unión

y se determina su afinidad relativa. Esto puede tener lugar después del propio procedimiento, como en el propio procedimiento de selección, es decir por unión y subsiguiente competición por el mismo anticuerpo, respectivamente ligando, así como por determinación cuantitativa de la cantidad unida de la respectiva molécula; como método alternativo a éste se puede observar, por ejemplo, la unión del ligando, respectivamente anticuerpo, que se empleó en el procedimiento de selección, impidiéndose su unión por adición como competidor de una determinada concentración de la respectiva molécula de unión, e identificándose las moléculas activas.

La molécula de unión específica, desprendida, y que se encuentra en solución o suspensión, se identifica por lo tanto o bien directamente por el correspondiente análisis, o bien se multiplica mediante un procedimiento de amplificación adecuado, seleccionado para la biblioteca de sustancias amplificable y, a continuación, mediante procedimientos adecuados se aísla y se identifica.

Como competidor de unión, no específico, se pueden emplear un gran número de sustancias tales como, por ejemplo, leche en polvo, proteína sérica tal como albúmina sérica o ácidos nucleicos tales como tARN o ARN de levadura. En el caso de la utilización de células vivas como membrana, se ha acreditado ventajosamente en el procedimiento conforme a la invención, emplear adicionalmente eritrocitos como competidor de unión no específico. Alternativamente, también se pueden emplear como competidores de unión fantasmas de eritrocitos (envolventes de membrana) u otras células diferentes, respectivamente sus membranas como, por ejemplo, líneas celulares de origen hematopoyético tales como células de linfomas o células leucémicas o células HeLa en suspensión, así como orgánulos celulares tales como núcleos celulares, mitocondrias y otros. Condición para ello es que las células, membranas celulares u orgánulos no porten en su membrana la proteína diana (target) del respectivo procedimiento.

Según muestra la experiencia, en tales procedimientos de selección las moléculas diana competitivas constituyen generalmente menos problema, que más bien la unión no específica de la clase de sustancia utilizada de las potenciales moléculas de unión (por ejemplo ácidos nucleicos, proteínas). Las dos pueden dar lugar a un gran número de interacciones con, en principio, todas las moléculas biológicas; en una superficie celular se plantea sobre todo el problema del gran número de uniones por puentes de hidrógeno que se pueden formar con proteínas, pero particularmente con proteínas glucosiladas, respectivamente lípidos. Si estas se caracterizan como "específicas" o "no específicas" no tiene importancia en la mayoría de los casos; pero en el complicado problema de la selección como moléculas diana en proteínas raras sobre superficies celulares, una unión, aún cuando sólo muy débil, a un gran número de moléculas de azúcar puede complicar demasiado el problema. Por lo tanto, conforme a la invención, para impedir una unión celular no específica se añaden preferentemente a la solución de unión y a determinadas soluciones de lavado, otras células, aquí eritrocitos, como competidores no específicos conforme a la invención. Esto tiene también la ventaja práctica de que la eficacia de los procesos de lavado, en donde no se habían añadido eritrocitos, se puede vigilar bien ópticamente por la coloración roja que dejan y eventualmente se pueden seguir lavando. El procedimiento permitió, después de solo cinco rondas, una selección altamente específica de moléculas de ARN ligantes a partir de una biblioteca.

Conforme a la invención, por moléculas diana seleccionadas se entienden preferentemente moléculas que se presentan respectivamente *in vivo* sobre la membrana de células, preferentemente de células de mamíferos, y para las cuales ya existe un ligando altamente específico tal como, por ejemplo un anticuerpo, un aptámero u otro ligando. En estas moléculas diana se trata en general de proteínas o moléculas de azúcar. Pero también pueden ser complejos de las dos clases de sustancias o ácidos nucleicos, respectivamente derivados y otras moléculas, que se presentan respectivamente en membranas biológicas.

Obviamente, este ligando se puede haber aislado también directamente antes de llevar a cabo el procedimiento.

La selección tiene lugar conforme a la invención en un medio acuoso. Por ello se entienden sistemas tampón, como son bien conocidos en el sector del ramo. Especialmente se trata de tampón fosfato, tampón HEPES y tampón Tris.

Entre las etapas b) y d) del procedimiento definido en la reivindicación 1 conforme a la invención se lleva a cabo un proceso de lavado. Éste sirve para separar material no ligado y para ello se sirve normalmente del mismo medio que el de las etapas a) y b), con o sin competidor no específico.

Como competidor de unión específico se emplea el ligando específico ya mencionado anteriormente. La(s) molécula(s) de unión seleccionada(s) de la etapa e) se amplifica(n), respectivamente se aísla(n) y caracteriza(n) a continuación mediante procedimientos adecuados. Estos procedimientos dependen del tipo de biblioteca de sustancias elegida, y son en cada caso evidentes y habituales para el experto en la materia. En el caso de bibliotecas de aptámeros, se amplifican por ejemplo los aptámeros con ayuda de una reacción PCR. Si se hace uso de una expresión en fagos o de tecnologías parecidas, entonces las partículas de fagos seleccionadas se multiplican en células bacterianas, generalmente en *E. coli*.

En el caso de bibliotecas químico-sintéticas (combinatorias) las moléculas seleccionadas se identifican con procedimientos adecuados. En el estado de la técnica se conocen, por ejemplo, procedimientos de codificación que, a través del acoplamiento covalente de las moléculas químico-sintéticas a i) partículas portadoras en forma de una codificación química (Blackwell, H. E., L. Perez, et al. (2001) *Chem. Biol.* **8**(12) :1167-1182; Clemons, P.A., A. N. Koehler, et al. (2001) *Chem. Biol.* **8**(12) :1183-1195), respectivamente a ii) bacteriofagos como codificación bioquímica (genética) (Woiwode, T. F., J. E. Haggerty, et al. (2003) *Chem. Biol.* **10**(9): 847-858), hacen posible una identificación posterior de las moléculas ligadas a partir de la biblioteca de moléculas. La ventaja del segundo

procedimiento consiste en que por el acoplamiento a bacteriófagos codificados toda la biblioteca de moléculas obtenida por síntesis combinatoria se puede emplear en una sola etapa como “grupo individual”, es decir como mezcla de varios cientos (aquí: 980) de sustancias químicas. De esta manera se prescinde de una logística extremadamente compleja, la cual sería necesaria individualmente en el caso de ensayos de unión con todas las sustancias (Fellouse, F. & K. Deshayes (2003) Chem. Biol. **10**(9): 783-786).

La expresión “nativa”, respectivamente “proteína, molécula nativa” se utiliza en la presente para caracterizar aquellas moléculas que se presentan en una conformación y un entorno que corresponde a la situación in vivo, de manera que se garantiza la total funcionalidad tanto de la molécula como también de las moléculas de unión encontradas.

En este caso, se trata especialmente de moléculas sobre la superficie de células. Se incluyen también en ellas las moléculas recombinantes que son expresadas por células y que se encuentran, por ejemplo, sobre la superficie celular, la superficie de orgánulos celulares o de vesículas artificiales y otras construcciones, las cuales imitan el entorno de la membrana.

Inhibidores de la endocitosis adecuados conforme a la invención comprenden por ejemplo citocalasina B, citocalasina D, citocalasina E, lantrunculina A y B, swinholida A y otras sustancias que bloquean la función del citoesqueleto. Conforme a la invención, por equipo se entiende una presentación en la que se ofrece al menos un competidor específico y un competidor no específico, eventualmente junto con una biblioteca de sustancias amplificable.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla a los ejemplos de ejecución mostrados. De forma representativa de otros sistemas de selección, con ayuda del procedimiento conforme a la invención se seleccionan aquí aptámeros que se unen específicamente a IAP y que, por ello, inhiben la apoptosis inducida por TSP-1 de células endoteliales cultivadas (Freyberg et al. BBRC 2000, 271, nº 3, páginas 584-588).

El siguiente aspecto general muestra los materiales utilizados y las fuentes de adquisición:

Material	Sociedad, lugar	Nº de pedido	Observación
Fenol	Carl Roth, Karlsruhe	0038.I	TE equilibrado
Taq polimerasa	Peqlab, Erlangen	01.1030	
T7-ARN polimerasa	MBI-Fermentas St. Leon-Roth	EP0111	
Transcriptasa inversa M-MuLV- RevertAid	MBI-Fermentas St. Leon-Roth	EP0441	
ATP, GTP	Carl Roth, Karlsruhe	K045.1 K047.1	Fabricante: TriLink, San Diego
2'-NH <sub>2</sub> -UTP	tebu-bio, Offenbach	N-1027	
2'-NH <sub>2</sub> -CTP		N-1026	
RQ1 DNase I, exenta de RNase	Promega, Mannheim	M6101	
Productos químicos,	Carl Roth, Karlsruhe		
Productos bioquímicos	Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen		

ADN sintético:

25 cebador A:

**GCGAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGATATTCGTCCATC**

cebador B:

**GGTCGAGAATTCAGTCGGACAGCG**

**Lib40:**

**GAATTCAGTCGGACAGCG (N<sub>40</sub>) GATGGACGAATATCGTCTCCC**



Agua bidestilada para preparar soluciones se trató con pirocarbonato de etilo (DEPC), 0,01% (v/v) durante 24 horas a 20 hasta 25°C y, a continuación, se sometió a autoclave durante 60 minutos a 121°C; se designa después como "DEPC-H<sub>2</sub>O".

### Soluciones

5	Tampón-TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM. pH 7,6
	Cl	Mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (volumen/volumen)
	1xTBE	Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM
	1xPBS+Mg	NaCl 130 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15,4 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,6 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM
10	Wp3E	NaCl 65 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,7 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,3 mM, MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM, tRNA (levadura) 12 µg/ml, suspensión de eritrocitos 50% (v/v)
	Wp3EC	como Wp3E + citocalasina B (concentración final 5 µM)
	WP3	NaCl 130 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15,4 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,6 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM, tRNA (levadura) 12 µg/ml
15	Wp3T	NaCl 130 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15,4 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,6 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM, tRNA (levadura) 12 µg/ml, Tween 20 (0,1% {v/v})

### Ejemplo 1

Construcción de un banco de secuencias de nucleótidos como ADN-PCR

Para la construcción de un banco de aptámeros se sintetizó un ADN por PCR según las prescripciones como las descritas por M. Homann y H. U. Göringer {(1999) *Nucleic Acids Res.* **27**(9), 2006-2014, con los tres oligonucleótidos descritos, es decir un oligonucleótido de ADN de 79 nucleótidos de longitud, como matriz, denominado "Lib40", que contenía una zona con 40 nucleótidos de longitud con una secuencia arbitraria, denominada "N40", representando N cada uno de los cuatro nucleótidos A, G, C ó T, y dos nucleótidos que actúan en la PCR, como cebadores denominados "cebador A" y "cebador B"; en el PCR se origina un ADN de doble cadena, en el cual por el promotor de la polimerasa T7ARN se pudo transcribir en el ARN la secuencia "N40". Paralelamente, se llevaron a cabo 20 tandas de PCR, cada tanda de PCR contenía en un volumen de 200 µl: 160 pmol de "cebador A", 160 pmol de "cebador B", 74,2 pmol de ADN-Lib40, solución tampón como la descrita por el fabricante de la enzima Taq-polimerasa (tampón "azul", Peqlab), aquí con una concentración final de MgCl<sub>2</sub> de 1,5 mM, cuatro trifosfatos nucleosídicos dATP, dGTP, dCTP y dTTP con respectivamente 0,25 mM, y 7,5 unidades de la enzima Taq-polimerasa. Protocolo de PCR: 20 segundos 94°C, después ciclo de PCR: 94°C durante 70 segundos, 44°C durante 90 segundos, 72°C durante 70 segundos, aquí se llevaron a cabo 8 ciclos, después se enfrió a 4°C. La purificación se efectuó por extracción fenólica, después extracción con Cl (cloroformo/alcohol isoamílico, relación volumétrica 24:1{v/v}), y una precipitación en etanol por adición de acetato de sodio, pH 5,6 hasta una concentración 0,3 M, y 2,5 veces el volumen de etanol p.a, después se incubó durante al menos 30 minutos a -20°C y después se centrifugó durante 25-35 minutos a 20.000 -21.000 g y 4-18°C. Después de separar el sobrenadante el precipitado se lavó con etanol p.a. al 70% (v/v). El precipitado se disuelve en un total de 100 µl de tampón TE y se conservó a -20°C.

### Ejemplo 2

Síntesis del Y-amino-ARN

Partiendo de ADN-PCR de doble cadena (correspondientes tandas de PCR: para la ronda de selección 1: 2,0 hasta 2,3 nmol de ADN del ejemplo 1; subsiguientes rondas de selección: 1,0 hasta 1,3 nmol ADN, del ejemplo 5, PCR "P2"; tanda analítica: 60 a 70 pmol de ADN de la segunda PCR, ejemplo 6), el cual contiene la secuencia promotora del bacteriófago T7 (véase ejemplo 1), se sintetiza el Y-amino-ARN por la polimerasa T7 polimerasa. Por Y-amino-ARN se denomina un ARN modificado, en el cual las pirimidinas (nucleótidos U y C) llevan en posición 2' en lugar del grupo OH un grupo NH<sub>2</sub>- (amino). La transcripción en presencia de ATP y GTP (respectivamente 1 mM) así como de los nucleótidos modificados 2'-NH<sub>2</sub>-UTP y 2'-NH<sub>2</sub>-CTP (respectivamente 1 mM, modificación véase más arriba, reemplazamiento del grupo hidroxilo por un grupo amino en posición 2') llevan al Y-amino-ARN, por incubación con la T7 ARN polimerasa comercial (2 unidades/µl) en presencia de las condiciones recomendadas por el fabricante y adicionalmente de MgCl<sub>2</sub> 2 mM en un volumen de 400 µl (ronda de selección 1:800 µl; tanda analítica: 40 µl) a 16°C +/-3°C e incubación durante 20 a 44 horas. Después, el ADN aún remanente se digiere por adición de MgCl<sub>2</sub> (incremento de la concentración en 2,74 mM) y DNase I exenta de R-Nase (concentración final 0,06 unidades/µl) e incubación a 37°C durante 135 minutos, definiéndose 1 unidad de DNase I como la cantidad de enzima que digiere completamente 1 µg de ADN en 50 µl en tampón con Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, (pH 7,9 a 25°C) en 10 minutos a 37°C.

Después de la adición de igual volumen de tampón TE, la solución se extrae primeramente con fenol y después con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1-{v/v}). Después se precipita el Y-amino-ARN con etanol (véase ejemplo 1) y después de lavar con etanol al 70% se disuelve en 300 µl de DEPC-H<sub>2</sub>O (selección 1: 1,2 ml; tanda analítica: 30 µl).

El rendimiento en Y-amino-ARN se determina por análisis después de la separación en un gel de poliacrilamida (9,47% (p/v) acrilamida y 0,53% bisacrilamida, urea 8 M y 1x tampón TBE) en presencia de 1x tampón-TBE y la separación de los ácidos nucleicos tuvo lugar en 12 a 16 V/cm durante 35 a 45 minutos. El gel se coloreó con el colorante fluorescente SybrGreen II (Molecular Probes; concentración según prescripción del fabricante) durante 20 minutos y se analizó la fluorescencia en el espectro visible bajo luz UV.

### Ejemplo 3

#### Preincubación del ARN

El Y-amino-ARN se emplea en el ensayo en una concentración de 150-360 nM; en la solución para la preincubación el Y-amino-ARN se encuentra en una concentración 2,02 veces superior, en "1xPBS+Mg" (NaCl 130 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15,4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,6 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y tARN de levadura, 0,3 mg/ml (volumen: tanda de selección 1: 4 ml; a partir de la tanda de selección 2, 2 ml: tanda analítica, 300 µl, véase abajo). La preincubación tiene lugar por calentamiento a 92°C durante 1 minuto y subsiguiente enfriamiento a 37°C en el espacio de 45 minutos. La solución se sigue empleando después directamente, o primero se almacena -20°C y se vuelve a descongelar antes de la siguiente utilización. La preincubación se continúa por incubación durante 20 minutos a 37°C; después se añade solución de citocalasina B (1 mM) en sulfóxido de dimetilo; concentración final 10 µM en la solución de unión) y una suspensión de eritrocitos (conserva de sangre) en la relación de volumen 1:1 (por ejemplo 2 ml de solución de preincubación con citocalasina B + 2 ml de suspensión de eritrocitos) y se mezclan entre sí, resultando en un volumen de la solución de unión de 8 ml (ronda de selección 1), respectivamente 4 ml (a partir de la ronda de selección 2) (tanda analítica, véase más abajo) de la cual se utilizan en cada caso 1 ml para cada frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con células HUVEC (véase ejemplo 4). Hasta la siguiente utilización la solución se guarda a 20 hasta 30°C durante un máximo de 10 minutos, o hasta 30 minutos a 4°C. En el procedimiento analítico (ensayo de unión) con aptámeros de ARN individuales, se trabaja con una solución de unión constituida por 300 µl de solución de preincubación (con citocalasina B) y 300 µl de suspensión de eritrocitos; dos cavidades se proveen con respectivamente 300 µl de la mezcla (solución de unión 600 µl) (véase ejemplo 4).

### Ejemplo 4

#### Selección de Y-amino-ARN, y ensayo de unión analítico: unión a células y competición por anticuerpos

Se cultivan células eucariotas según condiciones estándar, células HUVEC se siguen cultivando todavía durante tres o cinco días después de alcanzar la confluencia en frascos de cultivo con 75 cm<sup>2</sup> de superficie (ensayo de unión analítico: HUVEC en placas de 6 pocillos) (véase ejemplo 7) y, después, se emplean en el ensayo de unión (para cada uno de los Y-amino-ARN a ensayar en el ensayo de unión analítico se necesitan dos cavidades, véase más abajo). El volumen de una solución de lavado sirve en cada caso para un frasco, respectivamente cavidad de cultivo; las células, después de separado el medio de cultivo, se lavaron dos veces con medio de cultivo de células exento de suero (medio basal-IF, véase ejemplo 7; 37°C; volumen respectivamente 5 ml; analítico: 0,5 ml), después con solución de 1xPBS+Mg (3 ml; analítico: 0,4 ml; 18-25°C), después con 1xPBS+Mg con adición de citocalasina B 10 µM (3 ml; analítico 50 µl; 18-25°C). En cada caso 1 ml (analítico: 0,3 ml) de la suspensión de Y-amino-ARN-eritrocitos (véase ejemplo 3, "solución de unión" después de la preincubación) se vierte sobre las células después de separar la solución de lavado, y las células se incuban bajo agitación sobre un agitador de vaivén a una frecuencia de 30/min y a 21-30°C durante 60 minutos, de manera que cada 10 minutos la suspensión se reparte sobre las células adicionalmente a mano, por volteo de la cápsula de cultivo. Después de la adición de respectivamente 1,25 ml (analítico: 0,2 ml) de Wp3 se separa la suspensión. Las células se lavan sucesivamente con las siguientes soluciones (la temperatura de la solución de lavado se indica entre paréntesis); dos veces con respectivamente 1,5 ml (analítico: 0,2 ml) de Wp3E (4°C); una vez con respectivamente 4 ml (analítico: 0,5 ml) de Wp3EC durante 20 minutos bajo agitación (véase arriba; a 21 hasta 30°C); tres veces con respectivamente 2 ml (analítico: 0,25 ml) de Wp3T (21°C); cinco veces con respectivamente 4 ml (analítico: 0,5 ml) de Wp3 (21°C).

Como anticuerpo contra la diana deseada IAP (CD47) se preparó el anticuerpo anti-CD47 "Bric 126" en una concentración de 2 µg/ml en 1xHBS (HEPES 25 mM -NaOH pH 7,4, NaCl 0,137 M, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM) y con 12 µg/ml de tARN de levadura, y de esto se vertió sobre las células respectivamente 2 ml (analítico: 0,3 ml, y adicionalmente en lugar de "Bric 126" 0,3 ml de un control de anticuerpo de ratón IgG) para competición del Y-amino-ARN ligado, y se incubó 2 horas a 21-30°C bajo agitación sobre un agitador de vaivén (véase más arriba), de manera que cada 15 minutos la suspensión se repartió sobre las células adicionalmente, por volteo de la cápsula de cultivo. Para la separación de células, la solución se traspasó a recipientes Eppendorf y se centrifugaron 10 minutos a 900-1000 g y 12-18°C. El sobrenadante se separó y se precipitó con etanol (véase ejemplo 1, aquí: precipitación durante 18-24 horas); la centrifugación tuvo lugar a 20.000-21.000 g y 4-18°C, el precipitado se lavó con 70% (v/v) de etanol p.a., se disolvió en 50% (m/v) de isotiocianato de guanidina, citrato de sodio 25 mM, pH 7,0, se extrajo con una mezcla de fenol y Cl (relación en volumen 1:1); la fase acuosa se sometió a una precipitación con etanol y se centrifugó, y el precipitado se lavó (véase ejemplo 1) y después se disolvió en 50-110 µl de H<sub>2</sub>O (analítico: 10 µl); de ello se emplearon 50-80% para transcripción inversa (véase ejemplo 5).

### Ejemplo 5

#### Transcripción inversa del Y-amino-ARN y replicación de la copia de ADN por PCR (RT-PCR)

De los dos cebadores de ADN que se emplearon en la PCR para la síntesis del ADN de doble cadena (véase ejemplo 1), uno contenía la secuencia de ADN del promotor de la T7 ARN polimerasa. El segundo cebador se utiliza para la transcripción inversa para detectar el ARN por RT-PCR (transcripción inversa y subsiguiente PCR). Para ello, se incubaba el ARN purificado (véase ejemplo 4) junto con 960 pmol (ronda de selección 1) respectivamente 240 pmol (a partir de la tanda de selección 2, y "analítica") de "cebador B" en 110,8 µl (ronda de selección 1), respectivamente 27,7 µl (a partir de ronda de selección 2) (analítico, 13,9 µl), se calienta en un bloque calefactor durante 1 minuto a 65°C y en el espacio de 45 minutos se enfría a 42°C. Después se añade solución tampón 5 veces concentrada (según prescripción del fabricante para la enzima transcriptasa inversa MMuLV "Revert Aid") de manera que en la tanda existe una concentración final 1 de tampón, solución dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP, respectivamente en concentración final 1 mM), y 2,4 unidades/µl de la enzima transcriptasa inversa Revert-Aid (MB Fermentas) en un volumen total de 210 µl (ronda de selección 1), respectivamente 50 µl (a partir de la ronda de selección 2) (analítica: 25 µl), se mezclan entre si y se incubaba 30 minutos a 42°C y después 20 minutos a 48°C. Paralelamente se lleva a cabo una tanda en concentraciones iguales pero sin adición de ARN (control "K") para poder detectar la entrada no deseada de ADN después del PCR "PI" (véase más abajo). La enzima se inactiva después de la reacción por incubación durante 10 minutos a 68°C. Después tiene lugar una precipitación en etanol (con lavado del precipitado; véase ejemplo 1), y el ácido nucleico se disuelve en DEPC-H<sub>2</sub>O y se almacena a -20°C.

A continuación se efectúan sucesivamente dos reacciones PCR ("P1" y "P2"), de las cuales P1 sirve para la detección de la afinidad del grupo de ARN utilizado en el ejemplo 4 (por RT-PCR), y en la tanda analítica se identifican respectivamente los aptámeros específicamente ligantes (ejemplo 4, "analítico") por el RT-PCR, a través de una cantidad incrementada de ADN en el caso del anticuerpo específico (aquí Bric 126), en comparación con el anticuerpo-control (véase más abajo, "analítico"), por lo que se lleva a cabo una reacción PCR y una subsiguiente electroforesis en gel (véase ejemplo 6). Una parte definida de la solución (25-80%) (después de la transcripción inversa), respectivamente de la solución control K se mezclan respectivamente en un volumen de 400 µl (tanda analítica: volumen 40 µl) bajo las condiciones tampón recomendadas por el fabricante (aquí: "tampón PCR-azul", Peqlab, Erlangen) con solución dNTP (véase arriba, concentración en cada caso 300 a 329 µM), con los cebadores de ADN "cebador A" y "cebador B", respectivamente 320 pmol (analíticamente respectivamente 40 pmol) y con la enzima Taq-polimerasa, 5 a 15 unidades (analítico: 3,5 unidades), se mezclan en recipientes Eppendorf de 500 µl, y se lleva a cabo una reacción PCR ("P1") bajo las siguientes condiciones (véase ejemplo 1): 20 segundos a 94°C, después ciclo: a) 94°C, 1 minuto, 44°C, 1 minuto y 30 segundos; 72°C, 1 minuto y 10 segundos; en total 25 ciclos, después enfriar a 4°C hasta la siguiente forma de proceder. Después de un número de ciclos definido, por ejemplo 6, 9, 12, 15 y 25 ciclos, se toman muestras de respectivamente 4 µl (tanda analítica: sólo 18 ciclos, después sólo una muestra de 4 µl), las cuales se analizan después en una electroforesis en gel (véase más abajo). Las muestras se toman interrumpiendo el programa 10 segundos al final de cada ciclo, antes de terminar la fase de 72°C. En este caso, las muestras se toman alternativamente sin sacar los tubitos de muestra; o todas las muestras se ponen en un baño de hielo, se toman las muestras y las tandas se vuelven a colocar en el ciclador de PCR; a continuación se prosigue el programa hasta el final. El análisis de la cantidad de ADN sintetizada después del ciclo indicado tiene lugar tras la separación de las muestras en un gel de poliacrilamida con subsiguiente tinción con SybrGreen (véase ejemplo 12). Por lo tanto, en este lugar se puede determinar por RT-PCR cuantitativo la cantidad de Y-Amino-ARN ligada a la célula en cada ronda de selección. Cuando se manifiesta un incremento de la cantidad de ARN por la aparición del PCR-ADN, por ejemplo ya después del ciclo 6 del PCR, en lugar del ciclo 8 o 9 en anteriores rondas de selección, tiene que haber tenido lugar un enriquecimiento de Y-amino-ARNs más fuertemente ligantes. Entonces, después de otro PCR ("P2") para la replicación del ADN tiene lugar o bien otra ronda de selección (síntesis de Y-amino ARN, unión a células con selección, RT-PCR), o bien se caracterizan moléculas individuales por clonación, análisis de su afinidad y secuenciación de los clones obtenidos (véase ejemplo 6). El PCR preparativo ("P2") se llevó a cabo bajo condiciones análogas que el PCR "P1" (cebador respectivamente 0,8 µM), con las siguientes diferencias: 1) en un volumen total de 2 ml, que se reparte en 10 tandas de respectivamente 200 µl (analítico: 150 µl); y 2) el número de ciclos se limita a 12 (analíticamente: 20 ciclos). El análisis del PCR tiene lugar como antes, después del último ciclo por electroforesis en gel. Después de la extracción con fenol y Cl y una precipitación en etanol del ADN (véase ejemplo 1) tiene lugar la transcripción con T7 ARN-polimerasa para la síntesis del Y-amino-ARN (véase ejemplo 2).

### Ejemplo 6

Clonación y secuenciación de las copias de ADN de los Y-amino-ARN seleccionados, y análisis de su afinidad

La clonación de fragmentos de PCR después de la ronda 5 de la selección de los Y-amino-ARN y RT-PCR se llevó a cabo según métodos conocidos (Heyman, J. A., J. Cornthwaite, et al. (1999) Genoma Res. 9(4): 383-392; Shuman S. (1994) Biol. Chem. 269(51): 32678-32684), a partir de algunos clones se aisló ADN-plásmido (Birnboim, H. C. y J. Doly (1979) Nucleic Acids Res. 7(6): 1513-1523), y con los plásmidos de ADN se llevaron a cabo reacciones de PCR y, después, se sintetizó Y-amino-ARN, con los cuales se llevaron a cabo ensayos de unión y ensayos funcionales. Para ello, primero se preparó en dos etapas ADN-PCR (véase ejemplo 5, correspondientemente PCR "P2", analítico). Primera PCR: volumen 50 µl; matriz de ADN, respectivamente plásmido de ADN de los clones aislados individualmente (minipreparación de plásmidos de 1 ml de suspensión de bacterias, de los que se empleó 4% en los PCR); 18 ciclos. Segunda PCR: volumen 150 µl; matriz de ADN, ADN-PCR de la primera PCR, 14 ciclos. Seguía después la síntesis de ARN (véase ejemplo 2, "analítico"), la preincubación (ejemplo 3 "analítico") y el ligamiento (ejemplo 4, "analítico"). Seguía después la transcripción inversa (ejemplo 5, "analítico") y una PCR según las

siguientes prescripciones: de forma correspondiente a la descripción del ejemplo 5 ("P1") se llevaron a cabo respectivamente reacciones PCR en un volumen de reacción de 40 µl, llevándose a cabo respectivamente, de forma paralela, una reacción con muestras de las dos reacciones de competición con el anticuerpo Bric 126, respectivamente con el anticuerpo de control (véase ejemplo 4). Se llevaron a cabo 25 ciclos de PCR y, después de 7, 10 y 25 ciclos se tomaron muestras de respectivamente 4 µl (ejemplo 5) y se analizaron por electroforesis en gel (véase ejemplo 2); se puso de manifiesto una unión específica a la proteína diana CD47 por la superior cantidad de ADN-PCR obtenida después de la competición por el anticuerpo Bric 126, en comparación con el anticuerpo de control. Además, con los ARNs individuales ("aptámeros") se llevaron a cabo ensayos funcionales en cuanto a su efecto anti-apoptótico (véanse ejemplos 7 a 10). Se seleccionaron algunos clones y se secuenciaron los respectivos plásmidos de ADN. A partir de la secuencia de ADN obtenida se dedujo la secuencia de los Y-amino-ARN.

### Ejemplo 7

Cultivo de células endoteliales humanas de venas del cordón umbilical (HUVEC)

Soluciones (estériles):

Medio de cultivo: medio basal IF + 15% (v/v) de NCS, 5 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de heparina, 0,7 µg/ml de FGF, L-glutamina 2 mM [medio basal IF: mezcla 1:1 de medio Dulbecco modificado (IMDM) de Iscove y F12 de Ham, ambos de Life Technologies, Paisley (Inglaterra)]

NCS: suero de ternero recién nacido (Sebak, Aidenbach)

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (producción propia, parcialmente depurado de cerebro de cerdo)

Materiales:

Recipientes para el cultivo de células; gelatinizados

Realización:

El cultivo de HUVEC tiene lugar en recipientes para cultivo, recubiertos de gelatina, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de vapor de agua. El medio de cultivo se cambia cada 2-3 días; en el caso de confluencia las células se traspasan con una tasa de partición de 1:3 hasta 1:5. Los HUVEC crecen con fuerte inhibición por contacto y forman céspedes celulares unicapa con la morfología típica de adoquín. En el caso de confluencia, los cultivos alcanzan densidades celulares de 4-9 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Para ensayos de apoptosis se utilizan exclusivamente cultivos de HUVEC de los pasos 1-4.

Recubrimiento de los recipientes de cultivo:

Soluciones (estériles):

Solución de gelatina, 1% (p/v) en agua Milli-Q

Suspender 1 g de gelatina (testada para cultivo celular) en 100 ml de agua Milli-Q, disolver por tratamiento en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2 bar y almacenar a la temperatura ambiente.

PBS (NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM)

8 g/l de NaCl

0,2 g/l de KCl

1,44 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

0,2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

La solución preparada se somete a autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2 bar y se almacena a la temperatura ambiente. Se examina el valor del pH y se sitúa entre 7,2 y 7,4.

Materiales:

Recipientes para el cultivo de células

Realización:

Para el cultivo de células que crecen de forma adherente, los recipientes de cultivo se recubren con gelatina. El fondo de los recipientes de cultivo de células se recubre con gelatina estéril, los recipientes para el cultivo de células se dejan 15 minutos a la temperatura ambiente. La solución de gelatina se separa por succión, los recipientes para el cultivo de células se lavan una vez con PBS y, de este modo se pueden utilizar.

Subcultivo de células adherentes

Soluciones (estériles)

PBS

Tripsina/EDTA (0,05% (p/v)/0,02% (p/v))

0,1 ml de solución patrón de tripsina

0,05 ml de solución patrón de EDTA

5 Rellenar hasta 50 ml con PBS estéril y almacenar en porciones de 10 ml a -20°C

Materiales:

Recipientes para el cultivo de células, gelatinizados

Realización:

10 Todos los tipos de células expuestas se desprenden de la superficie de cultivo con solución de tripsina/EDTA. El medio de cultivo se separa por succión, el fondo del recipiente de cultivo se lava brevemente con PBS y se cubre con una solución de tripsina/EDTA (~1 ml para un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>). Inmediatamente, la solución de enzima se separa nuevamente por succión, de manera que sobre la célula quede una fina película de líquido. Las células se dejan durante 1-10 minutos a la temperatura ambiente y el desprendimiento de las células se sigue bajo el microscopio. El desprendimiento de las células se puede acelerar por suaves golpes del recipiente de cultivo sobre el canto. Las células se recogen en medio de cultivo reciente, eventualmente se cuentan y se siembran en recipientes de cultivo nuevos.

### Ejemplo 8

Determinación de la tasa de apoptosis por tinción de las células apoptóticas con DAPI

20 DAPI pertenece al grupo de los colorantes indólicos y es un colorante selectivo de DNS. El colorante se excita a 340-360 nm, y el máximo de emisión se sitúa a 480 nm. Se emplea para investigaciones de la apoptosis [véase Cohen et al., (1993) *Immunology Today*; **14**(3), 126-130].

Evaluación morfológica:

Soluciones:

PBS

25 Solución de formaldehído

4% (v/v) formaldehído en PBS

Solución DAPI (Molecular Probes, Leiden, Holanda)

2 µg/ml de DAPI en metanol

Materiales:

30 Cápsulas Petri (35 mm) o placas con 24 pocillos con células HUVEC en cultivo

Realización:

35 El sobrenadante del cultivo de una cápsula de Petri o de una placa con 24 pocillos se separa por succión, el césped celular se fija con 1 ml de solución de formaldehído sobre hielo durante 15 minutos, se lava dos veces con 2 ml de PBS, se trata 15 minutos con 0,5 ml de solución DAPI, se lava con PBS y se evalúa bajo el microscopio de fluorescencia. Se trabaja con el juego de filtros UV y un objetivo de 20 ó 40 aumentos. 500-1000 células se eligen arbitrariamente y se cuentan las células con núcleos apoptóticos.

El índice de apoptosis se calcula según la siguiente fórmula:

Índice de apoptosis [%] = número de células apoptóticas/número total de células x 100

### Ejemplo 9

40 Sistema de ensayo para aptámeros eficaces para anti-apoptosis

Las células se cultivan tal como se describe en el ejemplo 7. Las células se siembran en los correspondientes recipientes para cultivo (por ejemplo placa con 24 pocillos/0,5 ml por cavidad) y después de alcanzar la confluencia total se emplean para el ensayo propiamente dicho.

45 La inducción de la apoptosis tiene lugar por el TSP-1 producido y secretado por las propias células endoteliales, el cual se enriquece en el medio de cultivo (auto acondicionamiento del medio de cultivo).

Se llevan a cabo investigaciones en cuanto a la influencia de los diferentes aptámeros sobre la tasa de apoptosis de células endoteliales. Para ello, los aptámeros que están disueltos en el agua bidestilada tratada con DEPC (ejemplo

6) se diluyen en el medio de cultivo para HUVEC (ejemplo 7) y se emplean en las concentraciones indicadas. Como control positivo se emplea medio de cultivo sin aptámeros ni inhibidores algunos.

El medio con los aptámeros se añade a las células y se incuba durante tres días bajo condiciones de cultivo (ejemplo 7). Al cabo de 36 horas, el medio de cultivo se cambia una vez por medio de cultivo con aptámeros.

- 5 A continuación, las células se tiñen con DAPI, tal como se describe en el ejemplo 4 para la determinación de la tasa de apoptosis, y el índice de apoptosis se determina según la fórmula indicada.

El efecto claramente inductor de apoptosis del medio auto-acondicionado en el caso del control positivo, y la reducida apoptosis en el caso del control de inhibición, indican como controles internos el éxito del ensayo.

**Ejemplo 10**

- 10 Identificación de aptámeros eficaces como anti-apoptóticos con ayuda del procedimiento conforme a la invención

Las células se cultivan tal como se describe en el ejemplo 3. Las células se siembran en los respectivos recipientes para cultivo (por ejemplo placa con 24 pocillos/0,5 ml por cavidad). y tras alcanzar la confluencia total se emplean para el ensayo según el ejemplo 9. Se preparan las siguientes muestras:

(K) Medio de cultivo [medio auto-acondicionante, tasa basal de la apoptosis, control],

- 15 (1) medio de cultivo + aptámero 89, concentración 150 nM  
 (2) medio de cultivo + aptámero 89, concentración 300 nM  
 (3) medio de cultivo + aptámero 82, concentración 150 nM  
 (4) medio de cultivo + aptámero 82, concentración 300 nM

- 20 Al cabo de 72 horas de incubación bajo condiciones de cultivo, se fijan las células, se tiñen con CAPI y se examinan morfológicamente bajo el microscopio de fluorescencia. Se determinan el número de células apoptóticas y el número total de células, y se calcula el índice de apoptosis (células apoptóticas porcentuales).

Tabla 1: se testaron los siguientes aptámeros

MUESTRA N°	Denominación del aptámero, concentración	Índice de apoptosis [%]	Índice de inhibición [%]*
K	Control	3,59 ± 0,54	-
(1)	89, 150 nm	0,17 ± 0,15	95,24
(2)	89, 300 nm	0,16 ± 0,14	95,65
(3)	82, 150 nm	1,22 ± 0,27	66,03
(4)	82, 300 nm	0,74 ± 0,19	79,32

\* 100% = ya no es detectable apoptosis alguna, 0% = ningún efecto = control

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de moléculas de unión específicas contra moléculas diana seleccionadas, caracterizado porque
  - 5 a) una biblioteca de sustancias que contiene potenciales moléculas de unión se pone en contacto con las moléculas diana,
  - b) se añade un competidor de unión no específico,
  - c) se lleva a cabo, al menos una vez, un proceso de lavado,
  - 10 d) se añade e incuba en la biblioteca de sustancias un competidor de unión específico para la molécula diana seleccionada en una concentración que es al menos aproximadamente 10 veces, preferentemente al menos aproximadamente 100 veces, de modo particularmente preferido al menos aproximadamente 1000 veces superior que la constante de disociación KD(M) de la pareja de competidor de unión específico y molécula diana, y
  - 15 e) las moléculas de unión específicas, desprendidas, se aíslan mediante un procedimiento adecuado para la biblioteca de sustancias seleccionada y eventualmente se amplifican, y
  - f) la molécula diana en la etapa a) se presenta de forma nativa en unión de una biomembrana, preferentemente sobre la superficie de una membrana celular o en la matriz extracelular y, de modo particularmente muy preferido, en unión de células intactas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la biblioteca de sustancias es una biblioteca de sustancias amplificable seleccionada del grupo constituido por: bibliotecas de ácidos nucleicos, bibliotecas de expresión en fagos, bibliotecas de anticuerpos, bibliotecas de péptidos o bibliotecas químico-sintéticas.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la etapa a) y b) se llevan a cabo al mismo tiempo.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el competidor no específico se selecciona del grupo constituido por: leche en polvo, proteínas séricas tales como albúmina de suero o ácidos nucleicos tales como tRNA o RNA de levadura, eritrocitos, fantasmas de eritrocitos (envolventes de membrana), líneas celulares de origen hematopoyético tales como células de linfomas o células leucémicas, o células HeLa en suspensión, así como orgánulos celulares tales como núcleos celulares o mitocondrias, no portando las células, membranas celulares u orgánulos la molécula diana, preferentemente eritrocitos, fantasmas de eritrocitos (envolventes de membrana), líneas celulares de origen hematopoyético tales como células de linfoma o células leucémicas, o células HeLa en suspensión, así como orgánulos celulares tales como núcleos celulares o mitocondrias, no portando las células, las membranas celulares u los orgánulos la molécula diana, y de modo particularmente preferido eritrocitos y/o fantasmas de eritrocitos (envolventes de membrana), que no portan la molécula diana.
5. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque las etapas a) hasta e) se llevan a cabo varias veces sucesivamente, sin embargo preferentemente no más de tres a cinco veces, empleándose a partir de la segunda ronda las moléculas de unión obtenidas en la etapa e), en la etapa a), en lugar de la biblioteca amplificable.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la biblioteca es una biblioteca de aptámeros.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque en la etapa a) se añade un inhibidor de endocitosis en cantidad suficiente para inhibir la endocitosis, preferentemente citocalasina B en una cantidad de 1 a 10  $\mu\text{M}$ .
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la molécula diana seleccionada es una molécula situada sobre la membrana, de la cual también se conoce una forma soluble, y en la etapa a) se añade un inhibidor de proteasas.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el competidor de unión específico se selecciona del grupo constituido por anticuerpos y sus fragmentos, aptámeros, ligandos de las moléculas diana, así como competidores de bajo peso molecular.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el competidor de unión específico se une a una molécula de superficie clínica o diagnósticamente o de cualquier modo interesante, preferentemente IAP ó  $\alpha_v\beta_3$ .
11. Equipo para llevar a cabo el procedimiento según las reivindicaciones 1-10, que comprende un competidor de unión no específico y un inhibidor de endocitosis.