

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 850**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09818450 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2342562**

54 Título: **Método mejorado de presentación de ARN**

30 Prioridad:

**30.09.2008 US 101471 P**

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

**17.12.2013**

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)  
1 North Waukegan Road  
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**HSIEH, CHUNG-MING;  
KUTSKOVA, YULIYA A. y  
MEMMOTT, JOHN E.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 434 850 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

Método mejorado de presentación de ARN

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a la presentación de ARN, y particularmente a métodos de presentación de ARN que permiten realizar la selección de antígenos solubles y de superficie celular.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Pueden seleccionarse anticuerpos que se unan con alta especificidad y afinidad a casi cualquier epítipo estructural y se usan rutinariamente como herramientas de investigación y como agentes terapéuticos autorizados por la FDA (*Food and Drug Administration*). Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales terapéuticos y de diagnóstico constituyen un mercado mundial multimillonario.

20 Los métodos clásicos de inmunización de animales para obtener anticuerpos son lentos y engorrosos. Como consecuencia, se han desarrollado métodos para la selección *ex vivo* de un anticuerpo contra una molécula diana deseada usando bibliotecas de anticuerpos sintéticos. En algunos métodos, las bibliotecas de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se presentan en la superficie de un organismo, (por ejemplo, un bacteriófago, un virus, una célula de levadura, una célula bacteriana o célula de mamífero), y el organismo se selecciona para la expresión del anticuerpo deseado. En otros métodos, las bibliotecas de anticuerpos se expresan y se seleccionan en un sistema acelular *in vitro*. En dicho sistema, denominado presentación de ARN, las proteínas o los péptidos expresados están unidos, de manera covalente o por interacción estrecha no covalente, a su ARNm codificante para formar moléculas de fusión de ARN/proteína. El componente proteico o peptídico de una fusión de ARN/proteína puede seleccionarse para unirse a una diana deseada y la identidad de la proteína o del péptido puede determinarse por secuenciación del componente de ARNm codificante unido.

30 Los sistemas actuales de presentación de ARN *in vitro*, aunque son buenos para expresar dominios variables de anticuerpos sencillos, son ineficaces para expresar anticuerpos multidominio, tales como moléculas de anticuerpo monocatenario (scFv, *single chain Fv*). Esto se debe principalmente a las condiciones de reacción de los sistemas de expresión actuales *in vitro* y a la tendencia a perder el ADNc del scFv de longitud completa de la biblioteca a través de amplificación repetida por PCR.

35 Por tanto, en la técnica existe una necesidad de métodos de presentación *in vitro* mejorados para la selección de anticuerpos scFv contra una diana deseada.

40 Irving R. et al (*Journal of immunological methods*, Elsevier Science Publisher B. V.; Amsterdam, NL, vol. 248, no.1/02, 1 de febrero del 2001, páginas 31-45) es un artículo de revisión que aborda estrategias de presentación de fagos y de ribosomas para realizar la maduración por afinidad de las superficies de unión a antígeno en moléculas de scFv y dominios V. También desvela un método basado en un sistema acelular para la presentación de ribosomas, que incorpora una ARN polimerasa dependiente de ARN viral para la generación de bibliotecas mutantes al azar.

45 Kurz et al. (*Nucleic Acids Research* 15 de septiembre 2000, página E83) se refiere a un conector de Psoraleno C6 puromicina que se utiliza para ligar el aceptor peptídico al ARN usando fotorreticulación.

50 Zhu (documento US 2006/0246515) se refiere a composiciones y métodos para generar y explorar anticuerpos contra un antígeno específico.

**Sumario de la invención**

55 La invención resuelve los problemas anteriores proporcionando métodos mejorados de presentación de ARN *in vitro* para permitir la expresión y la selección fiable de moléculas de scFv a partir de bibliotecas de expresión. Sin embargo, particularmente adecuados para la expresión y la selección de moléculas de scFv, los métodos de la invención son también convenientes para realizar la presentación *in vitro* de todas las clases de proteínas, incluyendo antígenos tanto solubles como de superficie celular.

60 Por consiguiente, la invención tiene diversas ventajas que incluyen, pero sin limitación, proporcionar métodos mejorados de presentación de ARN *in vitro*, que son más sencillos y menos lentos de realizar que los métodos previamente descritos. Adicionalmente, los métodos de la invención permiten mejorar la expresión funcional de proteínas que contienen enlaces disulfuro intracatenarios, por ejemplo, moléculas de anticuerpos scFv.

65 En un aspecto, la invención proporciona un método de exploración de una biblioteca de presentación de ARN de anticuerpos scFv, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una molécula de ARNm de scFv reticulada con una puromicina o con un análogo de la misma, comprendiendo dicha molécula un ARNm que codifica

- un scFv 5' y una secuencia espaciadora 3', cuya molécula está reticulada con un conector de ácido nucleico monocatenario, comprendiendo el conector una puromicina, o un análogo de la misma, en un extremo 3' y un Psoraleno C6 en el extremo 5'; (b) traducir *in vitro* la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina en presencia de un marcador en condiciones levemente oxidantes para formar una molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada; (c) purificar la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada; (d) someter la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada purificada a una selección por antígenos con al menos un antígeno; y (e) recuperar las moléculas de ARNm de scFv reticuladas con puromicina/proteína marcadas purificadas usando perlas magnéticas basadas en afinidad.
- En una realización, el método comprende adicionalmente la etapa de (g) realizar la transcripción inversa del ARNm de scFv después de la selección por antígenos para producir un ADNc. En otra realización, el método comprende adicionalmente la etapa de (h) amplificar el ADNc.
- En una realización, el marcador es un marcador radiactivo, tal como, por ejemplo, <sup>35</sup>S metionina o cisteína.
- En una realización, la secuencia espaciadora 3' comprende de aproximadamente 0 a aproximadamente 200 aminoácidos, por ejemplo, aproximadamente 16 aminoácidos, y/o la secuencia espaciadora 3' comprende una etiqueta de afinidad.
- En una realización, el conector comprende, de 5' a 3': Psoraleno C6, ribonucleótidos 2'OMe que comprenden la secuencia UAGCGGAUGC (SEC ID N°: 20), seis grupos de trietilenglicol o PEG-150, dos restos de citidina y puromicina.
- En una realización, la molécula de ARNm de scFv está fotorreticulada con el conector de ADN por UVA, En otra realización, la molécula de ARNm de scFv comprende un promotor 5' seleccionado del grupo que consiste en T7, SP6 y T3. En una realización particular, la molécula de ARNm de scFv comprende una región 5' no traducida del virus del mosaico del tabaco.
- En una realización, la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada se purifica por cromatografía con oligo-dT. En otra realización, la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada se purifica usando perlas de agarosa con anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2. En otra realización adicional, la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada se purifica por cromatografía con oligo-dT y perlas de agarosa con anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2.
- En una realización, el antígeno es un péptido, una proteína o un hapteno marcado con biotina. En otra realización, el antígeno es una proteína de fusión con un fragmento cristalizable (Fc) de inmunoglobulina humana o con un fragmento cristalizable (Fc) de inmunoglobulina murina, o el antígeno es una población de células. En una realización particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo anti-IL-12, un anticuerpo anti-hemaglutinina (anti-HA), un anticuerpo murino o un anticuerpo humano.
- En una realización, la traducción *in vitro* de la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina se realiza en presencia de GSSH/GSH.
- En una realización, el método no comprende una etapa de protección de ARNm. En otra realización, el método no comprende una etapa de transcripción inversa *in vitro* antes de la etapa de purificación. En otra realización más antes, durante o después de cualquiera de las etapas (a) a (g) se añade un inhibidor de RNasa. En una realización, la etapa de purificación comprende realizar la transcripción inversa del ARNm en ausencia de ditiotreitól (DTT) para producir un ADNc.
- En determinadas realizaciones, el ADNc se eluye por hidrólisis alcalina a un pH de aproximadamente =8,0 a aproximadamente pH=10,0. De manera alternativa, el ADNc se eluye por calor, suficiente para desnaturalizar híbridos de ADN:ARN, por un ácido a un pH de aproximadamente =3,0 a aproximadamente pH=6,0, o por digestión con RNasa H.
- En una realización, el ADNc se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa. En una realización, la reacción en cadena de la polimerasa emplea una ADN polimerasa termoestable o ADN polimerasas seleccionadas del grupo que consiste en Platino HiFi y KOD.
- En otra realización, las perlas se seleccionan del grupo que consiste en estreptavidina-M280, neutravidina-M280, SA-M270, NA-M270, SA-MyOne, NA-MyOne, SA-agarosa y NA-agarosa.
- Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

- La *Figura 1* representa un esquema general de la tecnología de presentación de ARNm-scFv en algunas realizaciones de la invención.
- 5 La *Figura 2* representa un esquema general de la tecnología de presentación de ARNm-scFv en otras realizaciones de la invención.
- La *Figura 3* representa una descripción general de la construcción de la biblioteca de ADN.
- La *Figura 4a* representa resultados que muestran que puede generarse un scFv funcional como moléculas de ARNm-scFv.
- 10 La *Figura 4b* representa modelos de moléculas sin scFv y moléculas de ARNm-scFv.
- La *Figura 5* representa resultados que muestran que el scFv unido en el formato de molécula de ARNm-scFv es funcionalmente equivalente al de la molécula sin scFv.
- La *Figura 6* representa las tres construcciones de ARNm-scFv de D2E7 con diferentes longitudes espaciadoras 3'.
- 15 La *Figura 7* representa resultados que muestran que una longitud espaciadora más corta mejora la unión de ARNm-scFv a antígenos y el rendimiento de las moléculas de anticuerpo ARNm-scFv.
- La *Figura 8* representa las secuencias de los espaciadores Ck 3' de longitud corta, media y larga de D2E7 (SEC ID Nos: 42-44, respectivamente en orden de aparición).
- La *Figura 9a* representa las construcciones de ARNm-scFv de 17/9 con longitudes espaciadoras corta y larga.
- 20 La *Figura 9b* representa resultados que muestran que la longitud espaciadora más corta mejora la unión de la molécula de ARNm-scFv de 17/9 con el antígeno diana y produce moléculas de anticuerpo de ARNm-scFv.
- La *Figura 10* representa resultados que muestran que se requiere actividad PDI para alguna función del scFv.
- La *Figura 11* representa resultados que muestran que la presencia de DTT durante la transcripción inversa inhibe la unión de scFv de 17/9 con el antígeno hemaglutinina (HA).
- 25 La *Figura 12* representa resultados de electroforesis en gel de agarosa que muestran que el DTT no altera significativamente el proceso de transcripción inversa.
- La *Figura 13* representa resultados de electroforesis en gel de agarosa de diferentes condiciones de RT con o sin DTT y RNaseOUT™ tanto antes como después de la selección.
- La *Figura 14* representa resultados de electroforesis en gel de agarosa que muestran la recuperación de la secuencia Pyylos 40 VH cuando se realiza la transcripción inversa antes o después de la selección en comparación con la RT de pre-selección y elución alcalina de ADNc (carril izquierdo).
- 30 La *Figura 15* representa resultados de electroforesis en gel de agarosa que muestran que un inhibidor de RNasa conserva la recuperación del molde de ARN por transcripción inversa después de la selección por antígenos.
- La *Figura 16* representa resultados de una comparación alineada de un espaciador CL largo y CL corto en presencia o en ausencia de RNaseOUT™.
- 35 La *Figura 17* representa resultados de electroforesis en gel de agarosa que muestra una comparación alineada de la recuperación de un espaciador CL largo y CL corto en presencia o en ausencia de RNaseOUT™.
- La *Figura 18* representa resultados de electroforesis en gel de agarosa que cuantifica el scFv de 17/9 antes y después de una ronda de selección de ARNm-scFv.
- 40 La *Figura 19* representa una descripción general de quimeras entre D2E7 y 2SD4.
- La *Figura 20a* representa el porcentaje de recuperación después de la unión del antígeno entre las diferentes quimeras, mostrando que la tecnología de presentación de ARNm puede usarse para diferenciar aglutinantes con diferente afinidad.
- La *Figura 20b* representa el porcentaje de recuperación normalizado después de la selección por antígeno, mostrando que la tecnología de presentación de ARNm puede usarse para diferenciar aglutinantes con diferente afinidad.
- 45 La *Figura 21* representa la termoestabilidad de las moléculas de ARNm-scFv.
- La *Figura 22* representa resultados de electroforesis en gel de agarosa que muestra que el ARN puede recuperarse después de tratamiento a alta temperatura de las moléculas de ARNm-scFv.
- 50 La *Figura 23* representa las construcciones de ARNm-scFv de Y61 con longitudes espaciadoras cortas y largas así como con la construcción FP-y61scGene3 que comprende una cola poli-A en el conector de ADN entre el ARNm y la proteína de scFv.
- La *Figura 24* representa un esquema general de la tecnología de presentación de ARNm-scFv en otras realizaciones de la invención.

**Descripción detallada de la invención***Números de identificación de secuencias*

- 60 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos a las que se hace referencia en la memoria descriptiva han proporcionado los siguientes números de identificación de secuencias:

SEC ID N°: 1 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína de scFv de MAK1 95

SEC ID N°: 2 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína corta de scFv de Y61.

- 65 SEC ID N°: 3 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína larga de scFv de Y61.

SEC ID N°: 4 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína de Gene3 de scFv de Y61.

- SEC ID N°: 5 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína corta de scFv de D2E7.  
 SEC ID N°: 6 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína media de scFv de D2E7.  
 SEC ID N°: 7 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína larga de scFv de D2E7.  
 SEC ID N°: 8 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína corta de scFv de 17/9.  
 5 SEC ID N°: 9 - Secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína larga de scFv de 17/9.  
 SEC ID N°: 10 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de scFv de MAK195.  
 SEC ID N°: 11 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos larga de scFv de Y61.  
 SEC ID N°: 12 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos larga de scFv de Y61.  
 SEC ID N°: 13 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de Gene3PA de scFv de Y61.  
 10 SEC ID N°: 14 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de Gene3 de scFv de Y61.  
 SEC ID N°: 15 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos corta de scFv de D2E7.  
 SEC ID N°: 16 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos media de scFv de D2E7.  
 SEC ID N°: 17 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos larga de scFv de D2E7.  
 SEC ID N°: 18 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos corta de scFv de 17/9.  
 15 SEC ID N°: 19 - Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos larga de scFv de 17/9.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen algunos términos y expresiones.

## 20 **I. Definiciones**

El término “anticuerpo” incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos con injertos CDR, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos murinos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, una cadena ligera de anticuerpo (VL), una cadena pesada de anticuerpo (VH), un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv y un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (dAb).

30 La expresión “biblioteca de anticuerpos” se refiere a una pluralidad de moléculas de ADN o ARN que contienen una fase de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frame*) que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo. También incluye una pluralidad de proteínas de anticuerpo y moléculas de fusión de ácido nucleico/anticuerpo expresadas a partir de dichas moléculas de ADN o ARN.

35 La expresión “dominio variable de cadena pesada” se refiere al ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo y al producto de proteína de dicho ácido nucleico.

La expresión “dominio variable de cadena ligera” se refiere al ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo y al producto de proteína de dicho ácido nucleico.

40 La expresión “etiqueta epitópica” se refiere a una secuencia de aminoácidos corta específicamente reconocida por un anticuerpo que está unida química o genéticamente a una molécula para permitir su detección por dicho anticuerpo, por ejemplo, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA, una etiqueta Myc o una etiqueta T7.

45 La expresión “secuencias no anticuerpo” se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que aparece en las bibliotecas de anticuerpo de la invención, que no forman parte de la secuencia original del anticuerpo. Dichas secuencias incluyen, por ejemplo, etiquetas epitópicas.

50 La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN o a elementos genéticos necesarios para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular o sistema de expresión *in vivo*. Dichas secuencias se conocen bien en la técnica. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. Por ejemplo, un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si esto afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si este está posicionado de tal manera que se facilite la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que van a unirse son contiguas. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos.

60 La expresión “unión específica” o “se une específicamente a” se refiere a la capacidad de una molécula de unión para unirse a una diana con una afinidad de al menos  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-1}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M o menor y/o unirse a una diana con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno inespecífico.

65 El término “diana” se refiere a un antígeno o epítipo reconocido por un anticuerpo. Las dianas incluyen cualquier péptido, proteínas, sacáridos, ácidos nucleicos u otras moléculas, incluyendo moléculas pequeñas para las cuales

puede generarse un anticuerpo específico. En una realización, los anticuerpos son contra una proteína humana, por ejemplo, TNF $\alpha$ , IL-12, IL18, IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$ .

5 Una “sustitución de aminoácido conservativa” es una en la que un resto de aminoácido está reemplazado con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica.

10 La expresión “presentación de ARN” o “presentación de ARNm” se refiere a una técnica *in vitro* en la que las proteínas expresadas o los péptidos expresados están unidos de manera covalente o por interacción no covalente estrecha a su ARNm codificante para formar moléculas de “fusión de ARN/proteína”. La proteína o componente peptídico de una fusión de ARN/proteína puede seleccionarse para unirse a una diana deseada y la identidad de la proteína o del péptido puede determinarse por secuenciación del componente de ARNm codificante unido. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos 7.195.880; 6.951.725; 7.078.197; 7.022.479. 6.518.018; 7.125.669; 6.846.655; 6.281.344; 6.207.446; 6.214.553; 15 6.258.558; 6.261.804; 6.429.300; 6.489.116; 6.436.665; 6.537.749; 6.602.685; 6.623.926; 6.416.950; 6.660.473; 6.312.927; 5.922.545; y 6.348.315; cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

20 La expresión “anticuerpo monocatenario” o “scFv” se refiere a una parte de unión al antígeno de una región variable de cadena ligera y a una parte de unión al antígeno de una región variable de cadena pesada, unidas, usando métodos recombinantes, por un conector sintético que las permite constituirse como una sola cadena de proteína en la que el par de regiones VL y VH forma moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 85: 5879-5883).

25 La expresión “grupo funcional” se refiere a cualquier entidad biológica o química que confiere funcionalidad adicional a una molécula a la que se une.

30 El término “selección” se refiere a separar sustancialmente una molécula de otras moléculas en una población. Como se usa en el presente documento, una etapa de “selección” proporciona un enriquecimiento de al menos 2 veces, preferentemente de 30 veces, más preferentemente de 100 veces y más preferentemente de 1000 veces de una molécula deseada con respecto a moléculas no deseadas en una población después de la etapa de selección. Como se indica en el presente documento, una etapa de selección puede repetirse diversas veces, y en una estrategia determinada pueden combinarse diferentes tipos de etapas de selección.

35 La expresión “secuencia interruptora” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que hace que un ribosoma disminuya o detenga su tasa de traducción.

40 La expresión “soporte sólido” se refiere, sin limitación, a cualquier columna (o material de columna), perla, tubo de ensayo, disco de microtitulación, partícula sólida (por ejemplo, agarosa o sefarosa), microchip (por ejemplo, chip de silicio, de silicio-vítreo o de oro) o membrana (por ejemplo, la membrana de un liposoma o de una vesícula) al cual puede unirse un complejo por afinidad, directa o indirectamente (por ejemplo, a través de otros compuestos intermedios compañeros de unión tales como otros anticuerpos o proteína A) o en el que puede embeberse un complejo por afinidad (por ejemplo, a través de un receptor o canal).

45 La expresión “región conectora” se refiere a una región de ácido nucleico que conecta las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios VH y VL del anticuerpo en un gen de anticuerpo de scFv. Una región conectora está en fase con las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios VH y VL del anticuerpo de tal manera que se forma una fase de lectura abierta continua que contiene las regiones VH, VL y conectora. La expresión 50 también se refiere a la región que conecta el VH y VL en una proteína de scFv.

La expresión “aceptor peptídico” se refiere a cualquier molécula que puede añadirse al extremo C de una cadena de proteína en crecimiento por la actividad catalítica de la función peptidil transferasa ribosomal. Típicamente, dichas moléculas contienen (i) un nucleótido o un grupo similar a un nucleótido (por ejemplo, puromicina y análogos de la misma) (ii) un aminoácido o un grupo similar a un aminoácido (por ejemplo, cualquiera de los 20 D- o L- aminoácidos o cualquier aminoácido análogo de los mismos (por ejemplo, O-metil tirosina o cualquiera de los análogos descritos por Ellman et al., Meth. Enzymol. 202: 301, 1991) y (iii) un ligamiento entre los dos (por ejemplo, un ligamiento éster, amida o cetona en la posición 3' o, menos preferentemente, en la posición 2'); preferentemente, este ligamiento no perturba significativamente la estructura del anillo de la conformación natural del ribonucleótido. Además, esta expresión incluye, sin limitación, una molécula aceptora peptídica que está unida de manera covalente (directa o indirectamente a través de la secuencia de ácido nucleico interviniente) a la secuencia codificante de proteína, así como una que está unida a la secuencia codificante de proteína por algunos medios no covalentes, por ejemplo, a través de hibridación usando una segunda secuencia de ácido nucleico que se une al, o cerca del, extremo 3' de la secuencia codificante de proteína y que está propiamente unida a una molécula aceptora peptídica.

65

## **II. Visión general**

La presente invención presenta métodos mejorados de presentación de ARN *in vitro* que permiten la expresión y selección fiable de moléculas de anticuerpo de scFv a partir de bibliotecas de expresión.

Los métodos de presentación de ARN generalmente implican la expresión de una biblioteca de proteínas o péptidos, en la que las proteínas o péptidos expresados están unidos de manera covalente, o por interacción no covalente estrecha, con su ARNm codificante para formar moléculas de fusión de ARN/proteína. El componente proteico o peptídico de una fusión de ARN/proteína puede seleccionarse para unirse a una diana deseada y la identidad de la proteína o péptido puede determinarse por secuenciación del componente de ARNm codificante unido. Los métodos actuales de presentación de ARN no son óptimos para la expresión de anticuerpos de scFv ya que diversas etapas se realizan en condiciones reductoras que impiden la formación de enlaces disulfuro scFv intracatenarios y por tanto el plegamiento correcto de las moléculas de anticuerpo de scFv. Adicionalmente, los métodos actuales utilizan fragmentos VH o VL de anticuerpo en el proceso de selección.

La presente invención resuelve este problema técnico realizando el ensayo de presentación de ARN *in vitro* en condiciones ligeramente reductoras que favorecen un enlace disulfuro scFv intracatenario y por tanto el correcto plegamiento de las moléculas de anticuerpo de scFv. El uso del formato scFv en lugar de los dominios variables sencillos (por ejemplo, un dominio pesado variable (VH) sencillo) también elimina la necesidad de identificar un dominio ligero variable (VL) compatible necesario para la conversión del dominio VH seleccionado en un anticuerpo de IgG completo. Por consiguiente, aunque particularmente adaptados para la expresión y selección de moléculas de anticuerpo de scFv, los métodos de la invención también son convenientes para la presentación de ARN *in vitro* de todas las clases de proteínas.

Los métodos de la invención también proporcionan un protocolo más corto y sencillo para realizar la presentación de ARN. Esto se consigue, en parte, impidiendo la etapa lenta de realizar la transcripción inversa del ARNm en una fusión de ARN-proteína en el ADNc antes de la selección con una diana.

## **III. Método mejorado de exploración de presentación de ARN *in vitro***

En un aspecto, la invención presenta métodos mejorados de exploración de presentación de ARN *in vitro*. El método general es el siguiente:

### **1) Formación de fusiones de ARN/proteína**

Para generar ARNm se transcriben una o más bibliotecas de expresión de ADN de anticuerpo. Cualquier biblioteca de expresión de anticuerpo *in vitro* es adecuada (por ejemplo, bibliotecas de VH, VL o scFv), sin embargo, los métodos de la invención están particularmente bien adaptados a bibliotecas de scFv. Cualquiera de los métodos de transcripción reconocidos en la técnica es adecuado. Después de la transcripción de ARN, los moldes de la biblioteca de ADN se eliminan. Esto puede realizarse usando cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica, por ejemplo, por digestión con DNasa I.

Después de la eliminación del ADN, un aceptor peptídico se une al extremo 3' del ARNm de la biblioteca. Esto puede realizarse usando cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica. En una realización, se usa un conector que comprende 5' (Psoaleno C6)2'OMe(U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (Puromicina) 3' (SEC ID N°: 20), (donde X es un Trietilenglicol o PEG-150 y CC es una estructura de ADN estándar). En primer lugar se permite que el conector se una al extremo 3' del ARNm de la biblioteca mediante la formación de pares de bases complementarios. Después, el conector se reticula con el ARNm por activación UV de la molécula de Psoaleno C6.

Después de la adición del aceptor peptídico, el ARNm de la biblioteca se traduce en un sistema *in vitro*. Cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica de traducción *in vitro* es adecuado, por ejemplo, lisado de reticulocitos de conejo. Sin embargo, para permitir la correcta formación de enlaces disulfuro intracatenarios en las moléculas de scFv se añade una proteína disulfuro isomerasa (PDI) a la reacción de transducción *in vitro* y/o la reacción se realiza en condiciones ligeramente oxidantes. En una realización, se añade un agente oxidante suave (por ejemplo GSSG/GSH, por ejemplo GSSG 100 mM/GSH 10mM) a la reacción de traducción *in vitro*. En otra realización, los agentes reductores (por ejemplo, ditiotreitil (DTT)) se omiten de la reacción de traducción *in vitro*.

Al sistema de traducción *in vitro* pueden añadirse uno o más aminoácidos, o derivados de los mismos, marcados, de tal manera que el aminoácido marcado se incorpora en el anticuerpo resultante. Se contempla cualquier aminoácido marcado reconocido en la técnica, por ejemplo, un aminoácido radiomarcado, por ejemplo, metionina o cisteína marcadas con <sup>35</sup>S.

Durante la reacción de traducción *in vitro* las moléculas de ARNm comienzan a unirse covalentemente con sus productos proteicos mediante el aceptor peptídico (por ejemplo, puromicina) fusionado en el extremo 3'. Estas moléculas de fusión de ARN/proteína se purifican de la mezcla de reacción de traducción *in vitro*. Se contempla cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica de separación de moléculas de fusión de ARN/proteína de una

mezcla de reacción. En una realización, las proteínas de fusión de ARN/proteína se separan por cromatografía usando una resina de polidesoxitimidina (polidT). En otra realización, las proteínas de fusión de ARN-anticuerpo se separan uniéndose a un anticuerpo específico para un epítipo presente en el componente de anticuerpo de la proteína de fusión ARN/proteína. El epítipo puede ser una etiqueta de secuencia de aminoácidos, por ejemplo etiquetas FLAG o HA, incorporada en la secuencia de aminoácidos del componente de anticuerpo de la proteína de fusión de ARN-anticuerpo, por ejemplo, en el N terminal, C terminal o en el conector de la región intervariable.

Las fusiones de ARN/proteína de la invención, implican el uso de ARN desnudo. En una realización preferida, todos los reactivos que se ponen en contacto con las fusiones de ARN/proteína se tratan con reactivos inhibidores de RNasa, por ejemplo RNaseOUT™, ARNt de levadura, SUPERaseIn™, RNasin® y otros inhibidores de RNasa conocidos en la técnica.

## **2) Exploración de anticuerpos contra una diana deseada**

La biblioteca de fusiones de ARN/proteína se explora para la unión *in vitro* a una diana deseada. En general, las moléculas diana están unidas a un soporte sólido, por ejemplo, a perlas de agarosa. En una realización, la molécula diana está directamente ligada a un sustrato sólido. En otra realización, la molécula diana se modifica primero, por ejemplo, se marca con biotina, y después la molécula diana modificada se une a través de la modificación a un sustrato sólido, por ejemplo, estreptavidina-M280, neutravidina-M280, SA-M270, NA-M270, SA-MyOne, NA-MyOne, SA-agarosa y NA-agarosa. En otras realizaciones, el soporte sólido incluye adicionalmente perlas magnéticas, por ejemplo Dynabeads. Dichas perlas magnéticas permiten la separación del soporte sólido, y de cualquier fusión de ARN/anticuerpo unida, de una mezcla de ensayo usando un imán.

Después de la unión de las fusiones de ARN/proteína, el soporte sólido se lava una o más veces para eliminar las fusiones de ARN/proteína no unidas y después el ARN se amplifica. En una realización, el ARNm que está físicamente asociado con un anticuerpo o con una pluralidad de anticuerpos se amplifica para producir más ARNm. Se contempla cualquier método de replicación de ARN reconocido en la técnica, por ejemplo, usando una enzima ARN replicasa. En otra realización, el ARNm que está físicamente asociado con un anticuerpo o con una pluralidad de anticuerpos puede transcribirse en ADNc antes de amplificarse por PCR. El conjunto amplificado por PCR puede someterse a una o más rondas de exploración para enriquecerse con los anticuerpos de mayor afinidad.

Adicionalmente, o como alternativa, las fusiones de ARN/proteína pueden eluirse de soporte sólido antes de la amplificación del componente de ácido nucleico. Se contempla cualquier método de elución reconocido en la técnica. En una realización, las fusiones de ARN/proteína se eluyen usando condiciones alcalinas, por ejemplo, usando un pH de aproximadamente 8,0 a 10,0. En otra realización, las fusiones de ARN/proteína se eluyen usando condiciones ácidas, por ejemplo, usando un pH de aproximadamente 3,0 a 6,0. En una realización, las fusiones de ARN/proteína no se eluyen antes de la amplificación del componente de ácido nucleico, sino que en lugar de esto, las fusiones de ARN/proteína se añaden directamente a la mezcla de reacción de amplificación.

Adicionalmente, o como alternativa, el conjunto de ácidos nucleicos amplificado por PCR puede secuenciarse usando métodos de secuenciación de una sola molécula para determinar las secuencias de ácido nucleico de cada molécula de ARN/proteína seleccionada. En una realización, la amplificación por PCR puede realizarse usando una polimerasa correctora de errores de alta fidelidad, por ejemplo la ADN polimerasa termoestable KOD1 de *Thermococcus kodakaraensis* o la Taq ADN Polimerasa Platinum de alta fidelidad (Invitrogen).

Adicionalmente, o como alternativa, las secuencias de ácido nucleico pueden amplificarse en condiciones que den como resultado la introducción de mutaciones en ADN amplificado, introduciendo de esta manera diversidad adicional en las secuencias de ácido nucleico seleccionadas. Este conjunto de moléculas de ADN mutadas puede someterse a rondas de exploración adicionales.

## **IV. Construcción de bibliotecas**

Las bibliotecas de la invención pueden generarse a partir de cualquier fragmento de anticuerpo que sea capaz de unirse a una diana. En una realización, se generan bibliotecas de dominios variables de anticuerpos. Estas pueden ser dominios de VH y/o de VL. En otra realización, se generan bibliotecas de scFv.

Las bibliotecas de la invención también pueden incluir secuencias de ácido nucleico de anticuerpos que codifican regiones fuera de las regiones variables, por ejemplo, una región constante o fragmento de la misma, o una región bisagra.

Las bibliotecas de ácido nucleico de la invención pueden comprender ARN, ADN o híbridos que contienen elementos tanto de ARN como de ADN.

Ligamiento de ácido nucleico a aceptores peptídicos

Las bibliotecas de ácido nucleico de anticuerpos pueden modificarse para que contengan un resto aceptor peptídico. Esto puede facilitar la unión covalente de miembros individuales de bibliotecas de expresión de ácido nucleico con sus productos de proteína afines. Se contempla cualquier medio de unión de un aceptor peptídico con un ácido nucleico reconocido en la técnica, incluyendo los medios descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.643.768, la Patente de Estados Unidos N° 5.658.754, la Patente de Estados Unidos N° 7.195.880 y la Patente de Estados Unidos N° 6.951.725, cuyos contenidos se incorporan por referencia en el presente documento.

En un aspecto la invención presenta nuevos métodos y composiciones para la unión de un aceptor peptídico con bibliotecas de ácido nucleico. En una realización, puede sintetizarse una molécula de unión que comprende una molécula de Psoraleno C6 y una molécula aceptora peptídica, en la que la molécula de Psoraleno C6 y una molécula aceptora peptídica se fusionan con una secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de ácido nucleico es complementaria a las secuencias en el extremo 3' de la biblioteca de ácido nucleico. Dichas moléculas de unión pueden unirse, mediante emparejamiento de bases complementarias, con el extremo 3' de clones de bibliotecas de ácido nucleico. El Psoraleno C6 es sensible a luz ultravioleta (UV) y reticulará el conector con los clones de la biblioteca de ácido nucleico, ligando por tanto de manera covalente el aceptor peptídico con los clones de la biblioteca de ácido nucleico. En otra realización, la parte de ácido nucleico de la molécula conectora puede contener nucleótidos modificados, por ejemplo, 2 prima metoxi (2'OMe) ribonucleótidos. En otra realización la molécula conectora comprende adicionalmente un conector de Trietilenglicol o PEG-150 que separa la región de ácido nucleico que contiene la molécula de Psoraleno C6 y una molécula aceptora peptídica. En una realización, el conector puede comprender, de 5' a 3': Psoraleno C6, 2'OMe ribonucleótidos que comprenden la secuencia UAGCGGAUGC (SEC ID N°: 20), seis grupos de Trietilenglicol o PEG-150, dos restos de citidina y Puromicina. Dichos conectores pueden sintetizarse a petición, por ejemplo, en TriLink Bio Technologies, Inc.

**V. Métodos de exploración generales**

En un aspecto, la invención presenta métodos de exploración de bibliotecas de expresión de la invención para identificar anticuerpos capaces de unirse a una diana deseada. Se contempla cualquier método de exploración *in vitro* o *in vivo* que permita realizar la selección de un anticuerpo a partir de una biblioteca de expresión, basándose en la unión de los anticuerpos a una molécula diana.

En una realización, las bibliotecas de expresión de la invención pueden explorarse usando una presentación ligada a fenotipo-genotipo acelular *in vitro* reconocida. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 7.195.880; 6.951.725; 7.078.197; 7.022.479. 6.518.018; 7.125.669; 6.846.655; 6.281.344; 6.207.446; 6.214.553; 6.258.558; 6.261.804; 6.429.300; 6.489.116; 6.436.665; 6.537.749; 6.602.685; 6.623.926; 6.416.950; 6.660.473; 6.312.927; 5.922.545; y 6.348.315. Estos métodos implican la transcripción de proteínas *in vitro* a partir de un ácido nucleico de tal manera que la proteína se asocia o se une físicamente al ácido nucleico a partir del cual se origina. Al seleccionar una proteína expresada con una molécula diana, también se selecciona el ácido nucleico que codifica la proteína.

Para mejorar la expresión de proteínas scFv, los ensayos de exploración *in vitro* anteriormente indicados pueden requerir la adición o la eliminación de determinados reactivos. En una realización, al sistema de expresión *in vitro* pueden añadirse enzimas de proteína disulfuro isomerasa para mejorar la producción de moléculas scFv funcionales. En otra realización, puede añadirse un agente oxidante suave (por ejemplo, GSSG/GSH, por ejemplo GSSG 100 mM/GSH 10mM) a la mezcla de reacción de traducción *in vitro* de las proteínas scFv para permitir la formación de enlaces disulfuro intracatenarios en las regiones VH y VL de la molécula de scFv. En otra realización, pueden eliminarse agentes reductores (por ejemplo, ditiotreitól (DTT)) de la mezcla de reacción de traducción *in vitro* de la molécula de scFv.

En otra realización, al sistema de traducción *in vitro* pueden añadirse uno o más aminoácidos marcados, o derivados de los mismos, de tal manera que el aminoácido marcado llega a incorporarse en el anticuerpo resultante. Se contempla cualquier aminoácido marcado reconocido en la técnica, por ejemplo, un aminoácido radiomarcado, por ejemplo, metionina o cisteína marcadas con <sup>35</sup>S.

En una realización, los ensayos de exploración *in vitro* de la invención requieren que, después de la selección *in vitro* de un anticuerpo o de una pluralidad de anticuerpos, pueda realizarse la transcripción inversa del ARNm que está físicamente asociado con el anticuerpo o con la pluralidad de anticuerpos, para generar el ADNc que codifica dicho anticuerpo o dicha pluralidad de anticuerpos. Se contempla cualquier método adecuado para realizar la transcripción inversa, por ejemplo, transcripción inversa mediada por enzimas, por ejemplo, transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney.

Los métodos de exploración empleados en la invención pueden requerir la amplificación del ácido nucleico que codifica anticuerpos que se unen específicamente a una diana deseada. En una realización, el ARNm que está físicamente asociado con un anticuerpo o con una pluralidad de anticuerpos puede amplificarse para producir más ARNm. Se contempla cualquier método de replicación de ARN reconocido en la técnica, por ejemplo, usando una

enzima ARN replicasa. En otra realización, antes de amplificarse por PCR, primero puede realizarse la transcripción inversa del ARNm que está físicamente asociado con un anticuerpo o con una pluralidad de anticuerpos para generar ADNc. En una realización, la amplificación por PCR puede realizarse usando una polimerasa correctora de errores, de alta fidelidad, por ejemplo, la ADN polimerasa termoestable KOD1 de *Thermococcus kodakaraensis* o la Platinum Taq ADN Polimerasa de Alta Fidelidad (Invitrogen). En otra realización, la amplificación por PCR puede realizarse en condiciones que introducen mutaciones en el ADN amplificado, por ejemplo PCR propensa a error.

En otra realización, las bibliotecas de expresión de la invención pueden explorarse por presentación sobre la superficie de una célula, virus o bacteriófago y someterse a selección usando moléculas diana inmovilizadas. En las patentes de Estados Unidos Nos 7.063.943; 6.699.658; 6.423.538; 6.696.251; 6.300.065; 6.399.763; 6.114.147 y 5.866.344 se describen métodos de selección adecuados.

Los métodos de exploración empleados en la invención pueden requerir la introducción de diversidad en las bibliotecas de anticuerpos introduciendo sustituciones y/o deleciones de ácidos nucleicos que pueden dar como resultado una o más sustituciones y/o deleciones de aminoácidos en las moléculas de anticuerpos expresadas. Se contempla cualquiera de los métodos de mutagénesis reconocidos en la técnica, por ejemplo, mutagénesis al azar, mutagénesis “de recorrido” (walk through) y mutagénesis “de revisión” (look through). Dichas mutagénesis de un anticuerpo pueden realizarse usando, por ejemplo, PCR propensa a error, cepas “mutadoras” de levaduras o bacterias, o incorporación de cambios de ácidos nucleicos al azar o definidos durante la síntesis desde el principio (*ab initio*) de todo o parte de un anticuerpo. En una realización, puede crearse una biblioteca de moléculas de anticuerpo en la que uno o más aminoácidos están mutados al azar. En otra realización, puede crearse una biblioteca de moléculas de anticuerpo en la que uno o más aminoácidos están mutados con respecto a uno o más aminoácidos predeterminados.

Los métodos de exploración empleados en la invención también pueden requerir aumentar la rigurosidad del ensayo de exploración de unión a la diana para seleccionar anticuerpos con afinidad mejorada por la diana. Puede considerarse cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica para aumentar la rigurosidad de un ensayo de interacción anticuerpo-diana. En una realización, pueden modificarse una o más de las condiciones del ensayo (por ejemplo, la concentración salina del tampón de ensayo) para reducir la afinidad de las moléculas de anticuerpo por la diana deseada. En otra realización, puede reducirse la cantidad de tiempo permitida para que los anticuerpos se unan a la diana deseada. En otra realización, puede añadirse una etapa de unión competitiva al ensayo de interacción anticuerpo-diana. Por ejemplo, primero puede permitirse que los anticuerpos se unan a una diana inmovilizada deseada. Después, puede añadirse una concentración específica de diana no inmovilizada que sirve para competir por la unión con la diana inmovilizada, de tal manera que los anticuerpos con la afinidad más baja por el antígeno se eluyen de la diana inmovilizada, dando como resultado un enriquecimiento de anticuerpos con afinidad de unión a antígeno mejorada. La rigurosidad de las condiciones de ensayo puede aumentarse adicionalmente aumentando la concentración de diana no inmovilizada que se añade a ensayo.

Los métodos de exploración de la invención también pueden requerir rondas de selección múltiples para enriquecer uno o más anticuerpos con unión a diana mejorada. En una realización, en cada ronda de selección pueden introducirse mutaciones de aminoácidos adicionales en los anticuerpos usando métodos reconocidos en la técnica. En otra realización, en cada ronda de selección la rigurosidad de unión con la diana deseada puede aumentarse para seleccionar anticuerpos con mayor afinidad por una diana deseada.

Los métodos de exploración de la invención pueden requerir la purificación de proteínas de fusión ARN-anticuerpo a partir de los componentes de un sistema de traducción *in vitro*. Esto puede realizarse usando cualquier método de separación reconocido en la técnica. En una realización, las proteínas de fusión ARN-anticuerpo pueden separarse por cromatografía usando una resina de polidioxitimidina (polidT). En otra realización, las proteínas de fusión ARN-anticuerpo pueden separarse por cromatografía usando un anticuerpo específico para un epítipo presente en el componente de anticuerpo de la proteína de fusión ARN-anticuerpo. El epítipo puede ser una etiqueta de secuencia de aminoácidos, por ejemplo etiquetas FLAG, Myc o HA, incorporadas en la secuencia de aminoácidos del componente de anticuerpo de la proteína de fusión ARN-anticuerpo, por ejemplo, en el extremo N, extremo C o en el conector de la región intervariable.

La selección de anticuerpos a partir de las bibliotecas de la invención puede requerir el uso de moléculas diana inmovilizadas. En una realización, la molécula diana está directamente ligada a un sustrato sólido, por ejemplo, a perlas de agarosa. En otra realización, primero se modifica la molécula diana, por ejemplo, se marca con biotina, y después, la molécula diana modificada se une, a través de la modificación, a un soporte sólido, por ejemplo, estreptavidina-M280, neutravidina-M280, SA-M270, NA-M270, SA-MyOne, NA-MyOne, SA-agarosa y NA-agarosa.

#### Ejemplos de la invención

En todos los ejemplos, salvo que se indique de otra manera, se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

## **Materiales y métodos**

En general, la realización práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique de otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología con inmunoglobulina) y cría de animales. Véase, por ejemplo Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

### **Protocolo de presentación de ARNm para scFv**

La presentación de ARNm puede realizarse de acuerdo con el método mostrado en la Figura 2. Realizaciones particulares de este método se describen con mayor detalle más adelante. Estas realizaciones pretenden ilustrar los métodos de la invención y no deben considerarse como limitantes.

#### **1. Diseño de moldes de bibliotecas de anticuerpos**

Las construcciones de bibliotecas de ADN pueden diseñarse de acuerdo con métodos de generación de bibliotecas de anticuerpos conocidos en la técnica. En una realización, las construcciones de bibliotecas pueden codificar fragmentos de anticuerpo, es decir, fragmentos de anticuerpo de cadena ligera (VL) o fragmentos de anticuerpo de cadena pesada (VH). En una realización ejemplar, las construcciones de bibliotecas pueden codificar fragmentos variables monocatenarios (scFv).

#### **2. Preparación de antígeno diana**

Generalmente, la biblioteca de anticuerpos de presentación de ARNm puede seleccionarse contra antígenos marcados con biotina. Aunque el mejor antígeno para cada diana debe determinarse caso por caso, las siguientes consideraciones pueden usarse como una orientación general. Un antígeno diana está típicamente bien caracterizado, y es el isotipo genético relevante o dominante, determinado por polimorfismo (SNP y haplotipo) y/o análisis farmacogenético. Adicionalmente, un antígeno diana puede tener bioactividad razonable (comparable con el antígeno nativo), buena solubilidad y buenas propiedades químicas y físicas, y puede prepararse en cantidades suficientes para selecciones o exploraciones de bibliotecas y en bioensayos aguas abajo.

#### **3. Preparación de ADN de biblioteca**

El ADN de biblioteca y sus rendimientos de selección pueden amplificarse por PCR. La amplificación por PCR puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica. Las reacciones por PCR típicamente contienen moldes de ADN, tampones de reacción, dNTP, cebadores usados para la amplificación, ADN polimerasa y agua. Pueden prepararse tubos de reacción múltiples simultáneamente a partir de una mezcla maestra para aumentar la producción de ADN amplificado. Veinticinco (25) ciclos de PCR típicamente proporcionan amplificación suficiente, pero para obtener más productos pueden usarse hasta 35 ciclos.

#### **4. Purificación de ADN de biblioteca**

Si los productos tienen el tamaño correcto (biblioteca de ~850 pb para scFv, -500 pb para VH o VL) y contienen productos no específicos mínimos, los productos pueden usarse directamente en la reacción de transcripción. Como alternativa, los productos pueden purificarse en gel de agarosa preparativo cortando la banda específica del tamaño correcto. La concentración de ADN puede medirse en un espectrofotómetro.

#### **5. Transcripción de ARN**

La transcripción de ARN a partir de ADN de biblioteca puede realizarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Puede usarse un gran volumen de reacción para transcribir suficientes moldes de ADN para muestrear toda la diversidad de la biblioteca. En una realización ejemplar, pueden usarse  $1 \times 10^{13}$  copias de moldes de biblioteca en la reacción de transcripción de ARN. Una transcripción de ARN típicamente contiene 5-10  $\mu\text{g}$  de producto PCR, tampón de reacción, ATP, CTP, GTP, UTP y ARN polimerasa T7. La reacción de transcripción de ARN puede desarrollarse a 37 °C durante entre 2 horas hasta una noche. Pueden usarse tiempos más cortos seguidos de rondas de selección iniciales, sin embargo, incubaciones durante una noche pueden maximizar la producción de ARN de la reacción. Después de la transcripción de ARN, los moldes de ADN pueden eliminarse de la mezcla de reacción mediante digestión con DNasa I.

#### **6. Purificación de ARN por cromatografía en columna NAP**

Después de la transcripción, el ARN puede fraccionarse usando una columna NAP-10. Hasta aproximadamente 1 ml de reacción de transcripción puede cargarse en una columna NAP-10 para purificación de ARN. La columna puede

equilibrarse usando dH<sub>2</sub>O tratada con DEPC antes del fraccionamiento. El ARN puede eluirse de la columna usando aproximadamente 1,5X el volumen de reacción de dH<sub>2</sub>O tratada con DEPC (por ejemplo 750 µl por 500 µl de reacción de transcripción). El volumen de elución total puede ser menor de aproximadamente 150% del volumen de reacción de transcripción. El ARN puede, adicionalmente o como alternativa, fraccionarse usando una columna NAP-25.

#### 7. Control de calidad y cuantificación del ARN

El tamaño y la producción de muestras de ARN pueden analizarse usando electroforesis en gel o, como alternativa, midiendo la DO a 260 nm (DO<sub>260</sub>) de concentración de ARN en fracciones recogidas. Por ejemplo, la concentración molar de ARN de scFv puede calcularse de la siguiente manera:

$$[\text{ARN}] (\mu\text{M}) = [\text{ARN}] (\text{mg/ml}) \times 10^6 / (850 \times 330)$$

$$= \text{DO}_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 (\mu\text{g/ml}) \times 1000 / (850 \times 330).$$

$$\text{Producción de ARN (nmol)} = [\text{ARN}] (\mu\text{M}) \times \text{volumen} (\mu\text{l}) / 1000$$

La producción de ARN típicamente alcanza un máximo a aproximadamente 20 nmol/ml por 500 µl de reacción de transcripción.

#### 8. Ligamiento de ARN al conector

Un conector de ADN que contiene una molécula aceptora peptídica en su extremo 3' puede ligarse covalentemente a los extremos 3' de cada molécula de ARN mediante reticulación con UV. El aceptor peptídico, que puede entrar en el sitio A del ribosoma y acoplarse covalentemente con el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica naciente, puede finalmente permitir la asociación covalente del ARNm (genotipo) con la proteína codificada por este ARNm (fenotipo). Puede utilizarse un conector PEG6/10 ilustrativo que tiene la siguiente fórmula: 5' (Psoraleno C6) 2'OMe(U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (Puomicina) 3' (SEC ID N°: 20).

La modificación en 5' con Psoraleno C6 es sensible a la luz y actúa para crear un enlace covalente entre el conector y el ARNm mediante reticulación con UV. Una región estructural 2'OMe(U AGC GGA UGC) (SEC ID N°: 20) se hibrida con el sitio de hibridación del conector en 3' con la secuencia FLAG en el ARNm (véase la Figura 1). En la secuencia anterior, X indica "Espaciador 9" alternativamente conocido como Trietilenglicol o PEG-150. Este espaciador se ha optimizado para proporcionar flexibilidad para la inserción de puomicina en el sitio A del ribosoma eucariota. CC comprende una estructura de ADN convencional. Una modificación en 3' de puomicina se inserta en el sitio A del ribosoma para crear el ligamiento estable entre el conector y el péptido naciente. El coeficiente de extinción para el conector descrito en el presente documento puede ser de aproximadamente 147,7 DO<sub>260</sub>/µmoles. Dado que este conector es sensible a la luz, las soluciones que contienen este conector deben protegerse de la luz.

Para rondas iniciales de selecciones de bibliotecas, puede recomendarse una reacción de ligamiento a gran escala (de aproximadamente 5 nmol o de aproximadamente 3,1 x 10<sup>15</sup> moléculas de ARN transcritas) para muestrear toda la diversidad de una biblioteca de anticuerpos virgen con una diversidad estimada de aproximadamente 10<sup>12</sup> - 10<sup>13</sup>. Esta cantidad de ARN puede garantizar la incorporación de suficientes moldes en las reacciones de traducción para producir ~10 pmol de moléculas de presentación de ARNm funcionales. En rondas posteriores, la entrada de ARN puede reducirse a aproximadamente 0,5 nmol por selección. En una realización ejemplar, una reacción de ligamiento de ARN puede contener los siguientes componentes: ARN, agua, tampón de ligamiento químico, y el conector de PEG6/puomicina (1 mM). En una realización ejemplar, el volumen de reacción total es de aproximadamente 100 µl. En una realización preferida, la proporción molar conector/ARN puede ser mayor de aproximadamente 1,5. En una realización, la concentración final del conector en la reacción es de aproximadamente 15 µM, y la concentración de ARN en la reacción puede variar de aproximadamente 3 - 10 µM (= 0,3 - 1 nmol de entrada de ARN). Como una referencia, un ARN de scFv de 850 nt a 1 mg/ml = 3,56 µM, y la concentración de ligamiento máxima obtenible sería de aproximadamente 3,16 µM (aproximadamente 0,32 nmol).

La reacción de hibridación (que hibrida el conector con el ARN transcrito) puede realizarse en un ciclador térmico. En una realización preferida, la reacción de hibridación puede realizarse incubando muestras de aproximadamente 85 °C durante aproximadamente 30 segundos, después a aproximadamente 4 °C, usando una tasa de elevación de aproximadamente 0,3 °C por segundo. Después las reacciones pueden conservarse a aproximadamente 4 °C.

El ligamiento del conector/ARN hibridado puede realizarse mediante reticulación con UV. Esto puede realizarse usando cualquier método conocido por un experto en la técnica. En una realización, los tubos de reacción pueden colocarse en la parte superior de un envase de congelación congelado y colocarse directamente bajo una lámpara UV portátil de longitud de onda larga (aproximadamente 365 nm) y reticularse durante aproximadamente 15 minutos en la oscuridad. La eficacia de ligamiento típica es de aproximadamente 50 - 90%. Generalmente no se requiere purificación. Los productos de ligamiento pueden conservarse a -80 °C.

9. *Reacción de traducción*

En una realización ilustrativa, puede prepararse ~0,1% de ARN de entrada en moléculas de presentación de ARNm después de todas las reacciones y purificaciones. La traducción *in vitro* se realiza usando métodos y reactivos conocidos por un experto en la técnica. En una realización, la reacción de traducción utilizando la biblioteca de scFv utiliza aproximadamente 5 nmol de molde de ARN con aproximadamente 10 ml de lisado de reticulocitos en un volumen de reacción de aproximadamente 10 ml.

En la preparación para la reacción de traducción, pueden prepararse soluciones de GSSG/GSH (glutati6n oxidado/glutati6n reducido) a una concentraci6n final de aproximadamente 100 mM de GSSG/10 mM de GSH. La PDI se prepara disolviendo PDI en polvo en dH<sub>2</sub>O para alcanzar una concentraci6n de aproximadamente 1 Unidad/ $\mu$ l. La soluci6n de PDI puede conservarse a -20  $^{\circ}$ C.

Una reacci6n de traducci6n ilustrativa puede configurarse de la siguiente manera:

ARN (100-120 pmol/300 $\mu$ l o 500-600 pmol/1,5 ml)	X	X	$\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	hasta 73,7	hasta 370	$\mu$ l
Mezcla maestra de aminoácido (Met <sup>-</sup> )	15	75	$\mu$ l
GSSG 100 mM /GSH 10 mM	3,3	16,5	$\mu$ l
PDI (1 U/ $\mu$ l)	6	30	$\mu$ l
[ <sup>35</sup> S]Metionina	2	10	$\mu$ l
Lisado de reticulocitos	200	1000	$\mu$ l
Volumen total	300	1500	$\mu$ l

Las reacciones de traducci6n pueden incubarse en un ba6o de agua a 30  $^{\circ}$ C durante 1 - 2 horas y la formaci6n de la fusi6n ARN/proteína debe realizarse sin retraso. Puede observarse una disminuci6n significativa en la producci6n de la fusi6n ARN/proteína cuando el volumen de traducci6n supera los 3 ml; por consiguiente, puede prepararse una mezcla maestra de la reacci6n de traducci6n si el volumen de reacci6n es mayor de 3 ml, y despu6s dividirse en alícuotas m6s peque6as.

10. *Formaci6n de la fusi6n ARN/proteína*

Despu6s de la reacci6n de traducci6n, pueden a6adirse aproximadamente 100  $\mu$ l de KCl 2 M y aproximadamente 20  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1 M por cada 300  $\mu$ l de mezcla de reacci6n de traducci6n, e incubarse durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, o a -20  $^{\circ}$ C durante una noche. Como alternativa, pueden a6adirse aproximadamente 500  $\mu$ l de KCl 2 M y aproximadamente 100  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1 M por cada 1,5 ml de mezcla de reacci6n de traducci6n, e incubarse durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, o a -20  $^{\circ}$ C durante una noche. Esto estabiliza los ribosomas detenidos en el extremo de los moldes de ARNm y permite que la puomicina en el extremo del engarce de ADN entre en los sitios A de los ribosomas detenidos, que unen permanentemente las proteínas scFv traducidas con sus moldes de ARNm. La incubaci6n a temperatura ambiente puede acortarse si la reacci6n se conserva a -20  $^{\circ}$ C durante una noche. La reacci6n puede terminar a6adiendo aproximadamente 50  $\mu$ l o aproximadamente 250  $\mu$ l de EDTA 0,5 M por 300  $\mu$ l o 1,5 ml de reacci6n de traducci6n, respectivamente, para destruir los ribosomas. Las reacciones pueden conservarse a -20  $^{\circ}$ C. Puede extraerse una alícuota de 5-10  $\mu$ l para realizar posteriormente el recuento por centelleo.

11. *Purificaci6n de la fusi6n ARN/proteína por oligo-dT celulosa*

Esta etapa se incluye para purificar moléculas de presentaci6n de ARNm y moldes de ARN restantes de la reacci6n de traducci6n/fusi6n. Para la uni6n de oligo-dT, debe calcularse la cantidad de oligo-dT celulosa prelavada necesaria para capturar todos los moldes de ARN. Puede a6adirse un volumen suficiente de tamp6n de uni6n oligo-dT a la reacci6n de fusi6n para alcanzar aproximadamente una concentraci6n final 1X. Despu6s puede a6adirse la oligo-dT celulosa prelavada, y las reacciones se hacen girar durante 1 hora a 4  $^{\circ}$ C. Opcionalmente las reacciones pueden centrifugarse a aproximadamente 1500 rpm durante 5 minutos a 4  $^{\circ}$ C y el sobrenadante se desecha. Pueden transferirse perlas de oligo-dT celulosa y lavarse aproximadamente 6 veces con tamp6n de uni6n Oligo-dT 1 X usando columnas de centrifugaci6n, y el tamp6n se elimina típicamente por columnas de centrifugaci6n a aproximadamente 1000 rpm durante 10 segundos. El flujo de paso trav6s puede desecharse, pero el último lavado puede guardarse para el recuento por centelleo. Para reducir la concentraci6n salina y facilitar la eluci6n, puede a6adirse 1/10 del volumen de suspensi6n inicial de dH<sub>2</sub>O a las perlas de oligo-dT secas, que pueden centrifugarse inmediatamente durante 10 segundos y desecharse el flujo de paso. Las moléculas de presentaci6n de ARNm (y los moldes de ARN libres) pueden eluirse a6adiendo dH<sub>2</sub>O a las perlas e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. El eluado se recoge por centrifugaci6n a aproximadamente 4000 rpm (o mayor) durante 20 segundos. La eluci6n se repite típicamente una vez, y los eluados se combinan. Pueden retirarse 5  $\mu$ l de eluado para el recuento por centelleo. Opcionalmente, la eficacia de purificaci6n por oligo-dT tambi6n puede evaluarse por DO a 260 nm

(DO<sub>260</sub>) en un espectrofotómetro NanoDrop. Todos los moldes de ARN restantes y las moléculas de presentación de ARNm se recuperan teóricamente por las perlas de oligo-dT. Se añade tampón de unión FLAG 5X a los eluados para alcanzar aproximadamente una concentración final 1X. Las muestras pueden conservarse a -80 °C si no se continúa con la siguiente etapa de purificación con FLAG.

5 La recuperación con oligo-dT puede calcularse de la siguiente manera. Aproximadamente 5 µl de entrada (a partir de la reacción de fusión), aproximadamente 100 µl del último lavado y aproximadamente 5 µl de salida (eluado de purificación con oligo-dT). El último lavado se usa para evaluar el grado de lavado, y los otros dos recuentos se usan para calcular la recuperación de fusión de ARN/proteína a partir de la entrada de molde de ARN original. El  
10 rendimiento de fusión ARN/proteína (pmol) =  $(\text{CPM}_{\text{salida}} \times \text{Volumen}_{\text{salida}} \times 5 \mu\text{M} \times \text{Volumen}_{\text{lisado}}) / [\text{CPM}_{\text{entrada}} \times \text{Volumen}_{\text{entrada}} \times (\text{N}^{\circ} \text{ de metionina en el producto})]$ . Esta fórmula supone una concentración de metionina de 5 µM en el lisado de reticulocitos y todos los volúmenes usados en el cálculo se expresan como µl. Para rondas de selección anteriores el rendimiento de moléculas de presentación de ARNm es típicamente de 0,25-2%, pero puede aumentar al 10% en rondas posteriores. Por ejemplo, el número de rondas anteriores de metionina en la biblioteca PROfusión  
15 puede ser:

- Aproximadamente 3 µM para VH-Vκ scFv,
- Aproximadamente de 2 a 3 µM para VH-Vλ scFv,
- Aproximadamente 2 µM para VH,
- 20 • Aproximadamente 2 µM para Vκ, y
- Aproximadamente 1 µM para Vλ.

Estos números son promedios y se basan en secuencias de línea germinal, y un experto en la técnica apreciará que pueden cambiar sobre rondas de selección a medida que la biblioteca se enriquece hacia secuencias específicas.

## 25 12. Purificación de la fusión ARN/proteína por anti-FLAG M2 Agarosa

Esta etapa se diseña para purificar moléculas de presentación de ARNm a partir de moldes de ARN restantes. No es necesario continuar con esta etapa si la biblioteca se selecciona por competición disociativa con antígeno o por  
30 células que expresan antígeno. Puede calcularse la cantidad de perlas anti-FLAG M2 agarosa previamente lavadas necesarias para capturar todas las moléculas de presentación de ARNm. En una realización, la capacidad de unión de las perlas puede ser de aproximadamente 6 nmol de proteína de fusión por ml de suspensión al 50%. Para tener suficiente volumen de perlas para la manipulación durante la unión y el lavado, se recomienda usar al menos aproximadamente 200 µl de perlas previamente lavadas. El ejemplo proporcionado a continuación es para una  
35 reacción de traducción inicial de 300-µl.

Purificación con FLAG: para transferir 300 µl de anti-FLAG M2 agarosa previamente lavada al oligo-dT purificado resultante puede usarse una punta de pipeta de calibre ancho, que después puede hacerse girar durante 1 hora a 4  
40 °C. La incubación con anti-FLAG M2 agarosa puede continuar durante una noche. Opcionalmente, la anti-FLAG M2 agarosa puede centrifugarse a aproximadamente 1500 rpm en una centrifuga durante aproximadamente 1 minuto a 4 °C y el sobrenadante puede desecharse. Las perlas anti-FLAG pueden lavarse aproximadamente 5-6 veces con aproximadamente 500-700 µl de tampón de unión a FLAG 1 X, usando columnas de centrifugación (por ejemplo Columna de Centrifugación de Microcentrifuga Invitrogen™) y centrifugarse a aproximadamente 1000 rpm durante  
45 10 segundos para cada lavado (obsérvese que la columna Invitrogen™ puede centrifugarse a velocidades más elevadas, por ejemplo a aproximadamente 10.000 rpm). El flujo de paso puede desecharse. Adicionalmente, las perlas pueden lavarse dos veces con 700 µl de Tampón de Selección (véase más adelante) por centrifugación a aproximadamente 1000 rpm durante 10 segundos. El último lavado puede guardarse para el recuento por centelleo. Las moléculas de presentación de ARNm pueden eluirse añadiendo aproximadamente 400 µl de péptido FLAG 100 µg/ml (en tampón de selección) e incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente. El eluado puede recogerse  
50 por centrifugación a aproximadamente 3000 rpm (o mayor si fuese posible) durante 20 segundos. La etapa de elución puede repetirse una vez más añadiendo aproximadamente 400 µl de péptido FLAG 100 µg/ml. Ambos eluados pueden combinarse, y pueden extraerse aproximadamente 5 µl para el recuento por centelleo. Este volumen de péptido FLAG puede ser suficiente para la elución desde hasta aproximadamente 1 µl de suspensión al 50% y puede dividirse a la mitad (200 µl) si se usa menos suspensión y/o si se desea una concentración de fusión  
55 ARN/proteína más alta. Para impedir la degradación del ARN durante la conservación y selección con antígeno, puede añadirse una cantidad apropiada de inhibidor de RNasa conocida en la técnica (es decir, 1-2 U/µl de RNase OUT y 0,02 µg/ml de ARNt de levadura) a la biblioteca de presentación de ARNm purificado. Las muestras se conservan a -80 °C si no se continúa con la siguiente etapa de selección con antígeno.

60 Para cuantificar la recuperación de FLAG, aproximadamente 5 µl del resultado de elución y aproximadamente 100 µl del último lavado se cuentan en un contador beta. Puede esperarse una recuperación de 10-30% o mayor y puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula: % de recuperación de la molécula PROfusión =  $(\text{CPM}_{\text{salida}} \times \text{Volumen}_{\text{salida}}) / (\text{CPM}_{\text{entrada}} \times \text{Volumen}_{\text{entrada}})$

### 13. Selección de biblioteca por antígenos marcados con biotina

La selección se diseña para el enriquecimiento de moléculas que se unan específicamente a una diana de interés cuando la unión de la biblioteca con un antígeno alcanza el equilibrio. Puede ser necesario realizar una selección negativa (pre-aclarado) para eliminar aglutinantes inespecíficos y de matriz de una biblioteca de scFv virgen, pero puede omitirse si se usa una biblioteca preparada a partir de un solo molde, por ejemplo, pero sin limitación, bibliotecas preparadas para maduración por afinidad que hacen que la maduración por afinidad se base en un solo molde de scFv. Dependiendo del formato diana, varía el protocolo de selección. A continuación se indica un protocolo de selección ilustrativo para su uso con dianas marcadas con biotina. Este protocolo puede modificarse para incorporar antígenos diana en otros formatos, y puede aumentarse o disminuirse dependiendo del resultado deseado.

#### A. Preparaciones antes de la selección

15 Para la captura pueden usarse perlas magnéticas de estreptavidina (SA) que típicamente se prebloquean antes de su uso. Las perlas de SA pueden transferirse desde el frasco original a tubos de 1,5 o 2 ml, y lavarse dos veces con 2 ml de tampón de unión a FLAG 1X. Las perlas pueden bloquearse con 2 ml de tampón de Selección (de 2 horas a una noche) a 4 °C con rotación. Es importante preparar suficientes perlas tanto para el pre-aclarado como para las capturas por selección. Las perlas prebloqueadas pueden conservarse a 4 °C. Se usan aproximadamente 100 µl de perlas por cada 10 pmol de antígeno marcado con biotina, pero un experto en la técnica apreciará que el volumen de perlas de captura debe calcularse considerando la capacidad de unión de biotina libre (por ejemplo 650-900 pmoles/mg de perlas, donde la concentración de las perlas es típicamente de 10 mg/ml) con respecto al rendimiento de la reacción.

20

25 Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml pueden prebloquearse con tampón de unión a FLAG 1X durante aproximadamente 1 hora a una noche. Los tubos prebloqueados pueden usarse en todas las etapas de pre-aclarado y de selección. Típicamente se necesitan cuatro tubos para cada muestra: 2 para el pre-aclarado, 1 para las perlas y 1 para la selección.

30 Pueden obtenerse resultados óptimos pre-aclarando la biblioteca. La biblioteca de presentación de ARNm purificada con FLAG puede añadirse a las perlas (separadas del tampón), usando un volumen de perlas de SA igual a la mitad del volumen de captura. Las perlas pueden hacerse girar a 30 °C durante aproximadamente 30 minutos. La biblioteca de presentación de ARNm pre-aclarada puede separarse de las perlas usando un imán, y el pre-aclarado puede repetirse una vez más. Las perlas de SA pre-aclaradas por segunda vez pueden lavarse y contarse como se describe anteriormente para determinar si el fondo es alto. Esto también puede servir como un control negativo "no antigénico".

35

#### B. Selección de biblioteca: unión

40 Para las primeras rondas de selección, puede añadirse diana marcada con biotina (100 nM) al conjunto de la biblioteca pre-aclarada y hacer girar a 30 °C durante 1 hora. Para rondas de selección posteriores cuando se espera que la recuperación de las moléculas de unión a antígeno supere el 1%, la biblioteca pre-aclarada puede dividirse en 2 alícuotas iguales. Puede añadirse antígeno marcado con biotina a una alícuota y la otra puede servir como control negativo "no antigénico". Como alternativa, las perlas pre-aclaradas por segunda vez, lavadas, también pueden considerarse como un control "no antigénico", como se ha indicado anteriormente, aunque estas perlas tendrán un 'pre-aclarado' menos. La concentración de antígeno en rondas posteriores puede reducirse cuando la recuperación de moléculas de unión a antígeno supere el 5%. En particular, la concentración de antígeno debe reducirse si el antígeno parece estar 'cohesivo' y si en rondas previas se observó recuperación significativa. La concentración de antígeno puede reducirse en rondas posteriores cuando la recuperación de las moléculas de unión a antígeno llega a ser significativamente más alta que el fondo (por ejemplo, con respecto a un control no antigénico). Es importante prestar atención a la estequiometría entre la biblioteca y el antígeno para garantizar que hay al menos un exceso molar de 5 veces de antígeno sobre las moléculas de PROFusión de la biblioteca, especialmente a concentración de antígeno más baja.

50

#### 55 C. Selección de biblioteca: captura

El tampón de selección usado para bloquear las perlas de SA para la captura de biblioteca puede eliminarse por centrifugación y separación magnética. La biblioteca unida a antígeno puede transferirse a perlas de SA prebloqueadas (separadas del tampón), y después a la reacción de unión, y hacer girar a 30 °C durante 5 a 10 minutos. La cantidad de perlas de SA para la captura debe calcularse en base a la capacidad y a la concentración diana usada en la selección (véase anteriormente). La cantidad de perlas de SA debe disminuirse cuando disminuye la concentración diana para impedir los aglutinantes a las perlas de SA, pero típicamente se usan no menos de 50 µl de perlas.

60

65

## D. Selección de biblioteca: lavado

- Las perlas de SA puede recogerse usando un imán y lavarse con aproximadamente 1 ml de tampón de selección durante 1 minuto. Esta etapa puede repetirse aproximadamente 5 veces (aproximadamente 6 veces en total). El tiempo de lavado puede aumentarse en rondas posteriores para incorporar estrategias de selección por constantes de disociación en algunas dianas. Las perlas pueden lavarse una última vez con aproximadamente 1 ml de tampón 1X adecuado para la transcripción inversa, recogerse con un imán y resuspenderse en agua (una cuarta parte del volumen de perlas de capturas calculado anteriormente).
- Como otro ejemplo, pueden usarse Dynabeads™ (Invitrogen), pero un experto en la técnica apreciará que otras perlas pueden ser también adecuadas. Las Dynabeads™ pueden separarse de la biblioteca no unida por centrifugación y separación magnética. El sobrenadante puede retirarse con una punta de 1 ml, usando una nueva punta de filtro para cada tubo de selección de biblioteca para eliminar la contaminación cruzada. Las Dynabeads™ pueden lavarse con 1 ml de tampón de selección, y resuspenderse pipeteando suavemente o invirtiendo los tubos varias veces. Los tubos pueden ponerse de nuevo sobre el soporte magnético para la separación de las perlas al mismo tiempo que se procesa la siguiente biblioteca. Después de lavar todas las bibliotecas, el sobrenadante puede retirarse utilizando una punta de 1 ml usando una nueva punta de filtro para cada tubo de selección de biblioteca para eliminar la contaminación cruzada. Se repite durante cinco lavados. Las Dynabeads™ pueden lavarse dos veces con 1 ml de tampón de Cadena Primera 1X (Superscript II, Invitrogen) como se ha descrito anteriormente. En el último lavado, se retira 1/10 de la biblioteca a un tubo distinto para el recuento para determinar la recuperación de biblioteca si se desea. Las Dynabeads™ pueden capturarse por separación magnética y aproximadamente 100 µl de tampón de lavado puede guardarse para el recuento del fondo. Las Dynabeads™ pueden resuspenderse en agua, usando 1/4 parte del volumen de perlas de captura como se ha calculado anteriormente).

## E. Selección de biblioteca: recuento y cálculo de la recuperación

Comenzando desde la Ronda 3, se cuenta aproximadamente un 10 - 20% del último lavado y las perlas. No se aconseja contar más de 100 µl de perlas, ya que esto puede interrumpir los recuentos. El cálculo de la recuperación de selección de bibliotecas puede realizarse de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación de selección} = 100 \times \text{CPM}_{\text{Perlas Totales}} / \text{CPM}_{\text{Producción Total}}$$

## 14. Selección de bibliotecas en equilibrio por proteínas de fusión Fc

- En otra realización, la selección de bibliotecas puede realizarse para antígenos diana que se han fusionado con un dominio Fc de anticuerpo (por ejemplo proteínas de fusión Fc). Puede ser necesaria una selección negativa (pre-aclarado) para eliminar aglutinantes inespecíficos y de matriz de la biblioteca de anticuerpos virgen pero puede omitirse para maduración por afinidad. La especificidad de la selección puede mejorarse fusionando antígenos diana tanto a IgG1 humana como a IgG2a de ratón. Al tener diferentes dominios Fc en las proteínas de fusión Fc durante la selección de bibliotecas, puede minimizarse el riesgo de identificar aglutinantes de biblioteca específicos para la región Fc. Esto también permitirá que el aglutinante de la biblioteca sea arrastrado por dos perlas magnéticas diferentes (proteína G y anti-IgG de ratón), por lo tanto reduciendo adicionalmente la probabilidad de recuperar aglutinantes anti-proteína G o anti-anti-IgG de ratón. La proteína de fusión Fc diana también puede marcarse con biotina, y seleccionarse o por el método descrito en el presente documento o por el método descrito anteriormente en la sección 13. Debe observarse que las perlas magnéticas de proteína A pueden no ser adecuadas para la selección contra dianas de proteína de fusión Fc debido a la reactividad cruzada en determinadas partes del dominio VH de anticuerpo (por ejemplo VH originado a partir de secuencias de la línea germinal de la familia VH3 humana). Las perlas magnéticas adecuadas para arrastrar moléculas scFv-PROfusión de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, Dynabeads de Proteína G, Dynabeads Pan de IgG de ratón y otras Dynabeads M-280 contra las IgG humanas o de ratón disponibles. En general, la capacidad de las perlas de proteína G se considera que es de aproximadamente 25 µg de IgG1 humana (~167 pmol) por 100 µl de perlas magnéticas de proteína A/G.

## A. Preparaciones antes de la selección

- Las Dynaperlas de Proteína G o las Dynaperlas Pan de IgG de ratón (si el antígeno diana es una proteína de fusión Fc de ratón) pueden usarse para la captura, y típicamente se prebloquean antes de su uso. La cantidad de Dynabeads necesaria para pre-aclarar y seleccionar la biblioteca puede calcularse. Las Dynabeads pueden transferirse desde el frasco original a tubos de microcentrífuga de 1,5 o 2 ml y eliminar el tampón. Las perlas pueden bloquearse con tampón de selección 1 ml (2 horas a una noche) a 4 °C, o 1 hora a temperatura ambiente. Es importante preparar suficientes perlas tanto para el pre-aclarado como para las capturas de selección.

Los tubos de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml pueden prebloquearse con tampón de selección durante 1 hora a una noche y los tubos prebloqueados deben usarse para todas las etapas de pre-aclarado y de selección de bibliotecas.

- La biblioteca PROfusión scFv purificada con FLAG puede añadirse a las perlas prebloqueadas (separadas del tampón), puede usarse un volumen de Dynabead (proteína G o Pan IgG de ratón) igual a la mitad del volumen de

captura (como se ha calculado anteriormente) y la reacción se hace girar a 30 °C durante 30 minutos. La biblioteca de fusión pre-aclarada puede separarse de las perlas con un imán y el pre-aclarado puede repetirse una vez más. Las Dynabeads pre-aclaradas por segunda vez pueden lavarse y contarse como se ha descrito anteriormente para determinar si el fondo es alto. Esto también puede servir como un control negativo 'no antigénico'.

5

#### B. Selección de biblioteca: unión

Para las primeras rondas de selección, puede añadirse diana marcada con biotina (100 nM) al conjunto de la biblioteca pre-aclarada y hacer girar a 30 °C durante 1 hora. Para rondas de selección posteriores cuando se espera que la recuperación de moléculas de unión a antígeno supere el 1%, la biblioteca pre-aclarada puede dividirse en dos alícuotas (de 50/50 a 80/20 dependiendo de los recuentos de biblioteca). Puede añadirse antígeno marcado con biotina a una alícuota (del 50 a 80% del total), mientras que las otras alícuotas pueden servir como control negativo 'no antigénico'. Como alternativa, las perlas pre-aclaradas por segunda vez, lavadas, también pueden considerarse como un control 'no antigénico', como se ha indicado anteriormente, excepto que tendrán un 'pre-aclarado' menos. La concentración de antígeno puede reducirse si el antígeno parece estar 'cohesivo' y si en rondas previas se observó recuperación significativa. Adicionalmente, la concentración de antígeno puede reducirse en rondas posteriores cuando la recuperación de las moléculas de unión a antígeno llega a ser significativamente más alta que el fondo (control no antigénico). Es importante prestar atención a la estequiometría entre la biblioteca y el antígeno para garantizar que hay al menos un exceso molar de 5 veces de antígeno sobre las moléculas de PROfusión de la biblioteca, especialmente a concentración de antígeno más baja.

20

#### C. Selección de biblioteca: captura

El tampón de selección usado para bloquear las Dynabeads para la captura de bibliotecas puede eliminarse por centrifugación y separación magnética. La biblioteca unida a antígeno puede transferirse a Dynabeads prebloqueadas (separadas del tampón), y después a la reacción de unión, y hacer girar a 30 °C durante 20 minutos. La cantidad de Dynabeads usada para la captura puede calcularse como se ha descrito anteriormente en base a la capacidad de la perla, y a la concentración del antígeno diana usado en la selección. Para impedir la interacción de aglutinantes con las perlas, la cantidad de Dynabeads debe reducirse (pero no a menos de 500 µg o 50 µl) cuando la concentración de antígeno diana se reduce.

30

#### D. Selección de biblioteca: lavado

Las Dynabeads™ puede separarse de la biblioteca no unida por centrifugación y separación magnética. El sobrenadante puede retirarse con una punta de 1 ml, y puede usarse una nueva punta de filtro para cada tubo de selección de biblioteca para eliminar la contaminación cruzada. Pueden usarse nuevas puntas de pipeta para lavar las Dynabeads™ con aproximadamente 1 ml de tampón de Selección, y las Dynabeads™ pueden resuspenderse pipeteando suavemente o invirtiendo los tubos varias veces. Los tubos pueden colocarse de nuevo sobre el soporte magnético para la separación de perlas al mismo tiempo que se procesa la siguiente biblioteca. Después de lavar todas las bibliotecas, el sobrenadante puede retirarse con una punta de 1 ml (se usa una nueva punta de filtro para cada tubo de selección de biblioteca para eliminar la contaminación cruzada). Esta etapa puede repetirse durante cinco lavados. Las Dynabeads™ pueden lavarse dos veces con 1 ml de tampón de Primera Cadena 1X (Superscript II, Invitrogen) como se ha descrito anteriormente. En el último lavado, puede extraerse 1/10 de biblioteca a un tubo distinto para el recuento para determinar la recuperación de biblioteca si se desea. Las Dynabeads™ pueden capturarse por separación magnética y pueden guardarse aproximadamente 100 µl de tampón de lavado para el recuento del fondo. Las Dynabeads™ pueden resuspenderse en agua (usando 1/4 parte del volumen de perlas de captura como se ha calculado anteriormente).

40

45

#### E. Selección de biblioteca: recuento

50

Puede realizarse como se describe en la sección 13 (E) anterior.

#### 15. Selección de biblioteca por disociación por competencia con antígeno

La principal diferencia entre las selecciones por disociación (*off-rate*) y las selecciones por equilibrio es que la biblioteca se une primero al antígeno de selección antes de la purificación con FLAG. Después de la purificación con FLAG la biblioteca puede incubarse con una cantidad en exceso de antígenos o anticuerpos competidores (por ejemplo, cuando no se dispone de antígenos competidores) de tal manera que cualquier antígeno previamente unido que comienza a desunirse de las moléculas PROfusión durante la competencia por disociación se reemplaza por los competidores. El competidor se diferencia del antígeno preunido en que las moléculas PROfusión unidas al competidor pueden no recuperarse en la etapa de recuperación posterior. Estos pueden ser antígenos no modificados o antígenos en un formato diferente. Aunque los anticuerpos también pueden ser competidores, típicamente no son competidores tan eficientes como los antígenos y, su eficiencia disminuye a medida que aumenta la afinidad de la biblioteca por el antígeno. Esto es ventajoso para determinar la disociación de la biblioteca justo antes de la selección para identificar la correcta duración de la competición. Esta duración puede variar desde varias horas a varias semanas.

65

*A: Biblioteca precargada con antígeno marcado con biotina o proteína de fusión antígeno-Fc*

Las moléculas PROfusión pueden traducirse y purificarse por oligo-dT como se ha descrito anteriormente. La biblioteca purificada con oligo-dT puede equilibrarse añadiendo tampón de unión FLAG 5X a una concentración final de 1X (simplemente añadiendo 25% del volumen de la biblioteca). Los antígenos (marcados con biotina o fusión Fc) pueden añadirse a una concentración suficientemente alta y hacer girar a 30 °C durante 30 minutos para saturar la unión antígeno-anticuerpo. Las moléculas PROfusión pueden purificarse por anti FLAG M2 agarosa, como se ha descrito anteriormente. Es importante observar que una biblioteca PROfusión purificada con FLAG debe conservarse en hielo, pero no congelarse. Es importante prebloquear suficientes cantidades de perlas de captura como se ha descrito anteriormente.

*B: Determinación de la concentración del competidor y recuperación inicial de la biblioteca*

La cantidad de biblioteca recuperada de la etapa anterior puede calcularse para determinar su concentración molar. Esto representa la cantidad máxima de antígeno unido a la biblioteca, y puede usarse para calcular las cantidades necesarias (de 500x a 1000x) de la competición por disociación.

Puede añadirse un 10% de perlas prebloqueadas a una alícuota al 10% procedente de una biblioteca PROfusión unida a antígeno y hacer girar durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 4 °C. Las perlas pueden lavarse 5 veces con 1 ml de tampón de selección como se ha descrito anteriormente. Las perlas pueden contarse para determinar el porcentaje de biblioteca PROfusión unida por antígeno antes de la selección por disociación de la siguiente manera:

$$\% \text{ de recuperación} = 100 \times (\text{CPM}_{\text{Perlas}} / \text{CPM}_{\text{Producción}}) \times 10$$

*C: Selección de biblioteca: competición*

Puede añadirse un exceso molar de 1000 veces de competidor (por ejemplo antígeno o anticuerpo no modificado) a la biblioteca PROfusión purificada con FLAG y hacer girar aproximadamente a 30 °C durante un tiempo predeterminado que aplicará suficiente presión de selección para seleccionar clones con mejores disociaciones. La biblioteca se enfría con hielo durante aproximadamente 1 a 2 minutos para disminuir la velocidad de disociación antes de la captura con perlas.

*D: Selección de biblioteca: captura*

El tampón de selección usado para bloquear las Dynaperlas para la captura de bibliotecas puede retirarse por centrifugación y separación magnética. La librería unida a antígeno puede transferirse a Dynabeads prebloqueadas (separadas del tampón), y hacer girar a 4 °C durante aproximadamente 20 minutos.

*E: Selección de biblioteca: lavado*

Las Dynaperlas pueden recogerse por centrifugación y separación magnética de la biblioteca. El sobrenadante puede retirarse con una punta de 1 ml (se usa una nueva punta de filtro para cada tubo de selección de biblioteca para eliminar la contaminación cruzada, como se ha descrito anteriormente).

Las perlas pueden lavarse dos veces con aproximadamente 1 ml de tampón de Primera Cadena 1X (SuperScript II, Invitrogen) como se ha descrito anteriormente. En el último lavado, del 10 al 20% de la biblioteca puede extraerse a un tubo distinto para el recuento para determinar la recuperación de la biblioteca si se desea. Las Dynabeads pueden capturarse por separación magnética y pueden guardarse 100 µl de tampón de lavado para el recuento del fondo. Las perlas pueden resuspenderse en agua (usando 1/4 parte del volumen de perlas de captura como se ha calculado anteriormente).

*F: Selección de biblioteca: recuento y cálculo de la recuperación*

Puede contarse un 10 - 20% del último lavado y las perlas. Se aconseja evitar el uso de más de 100 µl de perlas, ya que esto puede interrumpir los recuentos. El cálculo de la recuperación de selección de bibliotecas puede realizarse usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación de selección} = 100 \times \text{CPM}_{\text{Perlas Totales}} / \text{CPM}_{\text{Producción Total}}$$

*16. Transcripción inversa de rendimientos de selección de biblioteca*

La transcripción inversa puede realizarse con Transcriptasa Inversa Superscript II (Invitrogen™). El volumen de cada reacción se puede aumentar de acuerdo con el volumen de perlas después de la selección. Los rendimientos pueden analizarse por transcripción inversa (RT, por las siglas *Reverse Transcription*) con pares de cebadores apropiados. Por ejemplo, para bibliotecas kappa, pueden usarse los cebadores "Ck Reverse" o "Ck5-FLAGA20-Rev", para bibliotecas lambda pueden usarse los cebadores "CJL Reverse" o "CL5FLAGA20-Rev" y para la biblioteca VH

humana de CMSP (Células Mononucleares de Sangre Periférica) pueden usarse los cebadores “Lib-GS-Rev” o “VH-GSFLAGA20-Rev”.

5 El cebador para la transcripción inversa debe tener al menos la misma secuencia 5' terminal que la del siguiente cebador inverso de la PCR, para impedir que queden cebadores residuales procedentes de la reacción de transcripción inversa que crean productos de amplificación que tienen diferentes secuencias 3' terminales. Esto es especialmente importante si en la RT se usan los cebadores “Ck Reverse”, “CJL Reverse” o “Lib-GS-Rev” más cortos porque cualquier cantidad residual de estos cebadores puede participar en la siguiente PCR y crear productos que no tengan la cola de poli-A.

10

**Tabla 1: Cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación de rendimientos de selección de bibliotecas**

Ck Reverse	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGA TGGTGCAGCCACAGTTCG
Ck5-FlagA20 Rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATG CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGAT GGTGCAGCCACA
CJL Reverse	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGT GGGGTTGGCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT
CL5FLAG A20 Rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATG CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTG GGGTTGGCCTTG
Lib-GS-Rev (VH, CMSP)	CGCTACCTCCGCCAGAC
VH-GSFLAGA20-Rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATG CTTGTCATCATCATCTTTATAATCGCTACCTCCGC CGCCAGAC

15 Condiciones de reacción de RT ilustrativas

Para una reacción de un volumen final de 200 µl, puede prepararse una reacción TR de la siguiente manera:

Perlas (en agua)	X µl
dH <sub>2</sub> O	hasta 108 µl
cebador inverso 10 µM	2 µl
dNTP 10 mM	10 µl

20

Incubar a 65 °C durante 5 minutos, enfriar con hielo. Añadir:

Tampón de Primera Cadena 5x	40 µl
DTT 0,1 M	20 µl
RNase OUT	10 µl

25

La reacción puede incubarse a 42 °C durante 2 minutos antes de añadir transcriptasa inversa SuperScript II 10 µl. La reacción puede dividirse en alícuotas de 100 µl e incubarse a 42 °C durante 50 minutos con agitación ocasional. Después, los tubos pueden incubarse a 95 °C durante 5 minutos después de la reacción. Las perlas pueden aislarse y el sobrenadante transferirse a nuevos tubos. Típicamente las muestras pueden agruparse si proceden de la misma producción de selección. Las perlas resuspendidas en agua (mitad del volumen de TR). Los tubos pueden incubarse a 95 °C durante 5 minutos después de la reacción y las perlas pueden capturarse con un imán, y el sobrenadante puede agruparse con el sobrenadante previamente transferido. Esto representa el molde de ADNc para la amplificación por PCR de producciones de selección.

30

### 17. Selección de biblioteca contra antígeno de superficie celular

Las principales diferencias entre la selección de bibliotecas PROfusión contra antígenos de superficie celular y contra antígenos solubles marcados con biotina son que los grupos de ARNm en las moléculas PROfusión están protegidos de degradaciones por RNasa celular por complementación del ADNc, y por tanto es necesario realizar la transcripción inversa en ADNc antes de realizar las selecciones de las bibliotecas. La reacción de la transcripción inversa puede realizarse antes o después de la purificación con FLAG dependiendo del volumen de biblioteca después de la purificación con oligo-dT. Es importante observar que el agente reductor DTT no debe incluirse en la transcripción inversa, o en cualquier etapa previa a la selección de bibliotecas, para conservar los enlaces disulfuro intracatenarios de la molécula de scFv.

#### A: Preparación de biblioteca después de purificación con oligo dT

En una realización, puede usarse un volumen de traducción inicial de 10 ml apropiado para la primera ronda de selección, pero debe observarse que la siguiente metodología puede adaptarse fácilmente a reacciones de traducción más pequeñas.

Las moléculas PROfusión pueden traducirse y purificarse por oligo dT como se ha descrito anteriormente. La biblioteca purificada debe recuperarse en un volumen de dH<sub>2</sub>O igual a o menor que el volumen de lisado de reticulocitos usado para la traducción. La producción, último tampón de lavado, y 10 µl de biblioteca pueden contarse para determinar el rendimiento y el porcentaje de recuperación, como se ha descrito anteriormente.

#### B: Unión a FLAG

La biblioteca purificada con oligo dT puede equilibrarse a una concentración final de PBS 1X añadiendo la 1/4 parte de PBS 5X del volumen de la biblioteca. La cantidad de perlas de anti-FLAG M2 agarosa necesarias para capturar todas las moléculas PROfusión puede estimarse (por ejemplo, estimando la capacidad de unión de las perlas a aproximadamente 6 nmol de proteína de fusión por ml de suspensión al 50%). Para tener suficiente volumen de perlas para la manipulación durante la unión y el lavado, se recomienda usar menos de 200 µl de las perlas prelavadas. Puede usarse una punta de pipeta de calibre ancho para transferir anti-FLAG M2 agarosa a un tubo nuevo. Las perlas pueden centrifugarse (a 1500 rpm durante 1 minuto) y el tampón puede eliminarse. Las perlas pueden lavarse de dos a tres veces con PBS 1 ml para eliminar cualquier pequeña cantidad de detergente presente en el tampón de conservación. La biblioteca purificada con oligo dT puede transferirse en PBS 1X a las perlas de anti-FLAG M2 agarosa lavadas y hacer girar a 4 °C durante 1 hora a una noche.

#### C: lavado con FLAG

Como una etapa opcional, las perlas de anti-FLAG M2 agarosa pueden centrifugarse a 1500 rpm durante 1 minuto, a 4 °C y desecharse el sobrenadante. Puede usarse PBS 1X para transferir las perlas sobre una columna Mini-spin de Bio-Rad™ o una Columna de Centrifugación en Microcentrífuga Invitrogen™ y después el tampón puede retirarse centrifugando a 1000 rpm durante 10 segundos. La columna de Invitrogen™ puede centrifugarse a mayor velocidad (por ejemplo a 10.000 RPM si es posible). Las perlas pueden lavarse 4X con PBS 1 X 500 - 600 µl de y el PBS puede centrifugarse a través de la columna. Las perlas pueden lavarse 2X con tampón de primera cadena 1 X RT (sin DTT) 500 - 600. El flujo de paso puede desecharse, pero se aconseja guardar el último lavado para realizar el recuento por centelleo.

#### D: Elución con FLAG

Las moléculas de PROfusión pueden eluirse añadiendo 450 µl (obsérvese que, para volúmenes de M2 agarosa más pequeños, pueden usarse 230 µl) de péptido FLAG 100 µg/ml en Tampón de Primera Cadena (sin DDT) que contiene RNaseOUT a una dilución 1:20 y después incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido puede recogerse centrifugando a 3000 rpm, o a mayor velocidad, durante 20 segundos. Esta etapa puede repetirse una vez, y después las bibliotecas de ambas eluciones pueden agruparse.

#### E: Cálculo de recuperación con FLAG

En un contador beta se cuentan 5 - 10 µl de producción de elución y 100 µl del último lavado. El % de recuperación de moléculas PROfusión puede calcularse de la siguiente manera (obsérvese que se espera una recuperación del 10-30% o mayor):

$$= (\text{CPM}_{\text{salida}} \times \text{Volumen}_{\text{salida}}) / (\text{CPM}_{\text{entrada}} \times \text{Volumen}_{\text{entrada}})$$

#### F: Transcripción inversa

Pueden usarse los cebadores descritos en la sección 16 anterior

Condiciones de reacción de RT

Biblioteca PROfusión purificada	445 µl	890 µl
Cebador inverso 10 µM	5 µl	10 µl
dNTP 10 mM	25 µl	50 µl
Superscript II	25 µl	50 µl
Volumen total	500 µl	1000 µl

5 La reacción puede incubarse a 37 °C durante 1 hora, con o sin agitación. La biblioteca puede equilibrarse para la selección contra antígenos de superficie celular de la siguiente manera. Después de haberse completado la reacción de transcripción inversa, a la mezcla de reacción puede añadirse NaCl 5 M a 75 mM (15,3 µl a 1 ml y 7,5 a 500 µl de reacción). Si fuera necesario, para aumentar el volumen, a la biblioteca puede añadirse PBS adicional 1X. Antes de la selección, a la biblioteca puede añadirse el siguiente reactivo de bloqueo.

	Concentración final	
BSA, 50 mg/ml	21 µl	1 mg/ml
ADN de esperma de salmón, 10 mg/ml	10,5 µl	0,1 mg/ml

10 Puede ser necesaria una etapa de pre-aclarado para la selección de bibliotecas vírgenes, pero puede omitirse si se usa una biblioteca preparada a partir de un solo molde, por ejemplo una biblioteca preparada para maduración por afinidad.

15 Debe confirmarse, por citometría de flujo o análisis de transferencia de Western, que las células usadas para realizar el pre-aclarado de la biblioteca (células sin contacto con antígeno) no tengan expresión de antígeno diana en la superficie celular. Por ejemplo, estas células pueden ser las células parentales usadas para generar las líneas de células estables que expresan el antígeno, que presentan una situación en la que la única diferencia con la proteína de superficie conocida entre las células usadas para el pre-aclarado y para la selección deben ser en sí mismo el antígeno diana.

25 La cantidad de células que se necesita para pre-aclarar la biblioteca debe calcularse. Se trata de la cantidad de células sin contacto con antígeno necesaria para pre-aclarar la biblioteca y es la misma cantidad que para realizar la selección de bibliotecas. La cantidad de células ( $X$ ) se calcula a partir de diversos números: copias de antígenos sobre la superficie de células que expresan el antígeno ( $C$ ), tamaño de la biblioteca para la selección ( $S = \text{moles} \times 6 \times 10^{23}$ ) y fracción de la biblioteca que se unirá al antígeno diana ( $F$ ). Esto puede calcularse aproximadamente mediante esta fórmula que permite un exceso de 10 veces de antígeno diana o de fuerza de pre-aclarado:

$$X = 10 \times S \times F / C$$

30 Por ejemplo, suponiendo que un antígeno particular tiene un número de copias de superficie celular estimado de  $1 \times 10^4$ , y que en una biblioteca de anticuerpos sin tratar de 10 pmol puede recuperarse menos del 0,05% ( $5 \times 10^{-4}$ ) de la biblioteca por unión a antígeno o adherencia de fondo. La cantidad de células necesaria para el pre-aclarado y la selección es

$$X = 10 \times (10 \times 10^{-12} \times 6 \times 10^{23}) \times (5 \times 10^{-4}) / (1 \times 10^4) = 3 \times 10^6$$

40 En la práctica, la cantidad de células debe ser de  $5 \times 10^6$  o más para garantizar que después de realizar la centrifugación puede observarse sedimento celular.

G: Pre-aclarado de la biblioteca

45 La densidad celular puede contarse con un hemocitómetro o con un contador Coulter y pueden transferirse suficientes células a un tubo de centrifuga. Las células pueden centrifugarse a 1500 rpm a 4 °C, y resuspenderse con mucho cuidado en PBS 1 ml enfriado con hielo. La suspensión celular puede transferirse a un tubo de microcentrifuga de 1,7 ml con tapa a rosca. Durante la transferencia con la pipeta hay que tener cuidado de no cortar las células. Las células pueden centrifugarse a 1500 rpm y el PBS puede eliminarse. La etapa de lavado con PBS puede repetirse por segunda vez. La biblioteca de la etapa 13.3.3 debe añadirse inmediatamente a las células resuspendidas cuidadosamente. Después, los tubos pueden sumergirse en un baño enfriado con hielo, y agitarse durante aproximadamente 60 minutos. Las células pueden centrifugarse a 1500 rpm y la biblioteca puede transferirse a un nuevo tubo de células para un segundo pre-aclarado o para la selección de antígeno.

H: Selección de bibliotecas contra células que expresan antígenos

55 Se calcula la cantidad necesaria de células para la selección con antígeno. Esta cantidad es la misma que la calculada anteriormente para pre-aclarar la biblioteca. La cantidad de células ( $X$ ) se calcula a partir de diversos

números: copias de antígenos sobre la superficie de células que expresan el antígeno (C), tamaño de la biblioteca para la selección ( $S = \text{moles} \times 6 \times 10^{23}$ ) y fracción de la biblioteca que se unirá al antígeno diana (F). Esto puede calcularse aproximadamente mediante esta fórmula que permite un exceso de 10 veces de antígeno diana o de fuerza de pre-aclarado:

$$X = 10 \times S \times F / C$$

5

I: Selección de biblioteca

10 La densidad de las células que expresan antígenos puede contarse con un hemocitómetro o con un contador Coulter y pueden transferirse suficientes células que expresen antígeno al tubo de centrifuga.

15 Las células pueden centrifugarse a 1500 rpm a 4 °C, y resuspenderse con mucho cuidado en PBS 1 ml enfriado con hielo. La suspensión celular puede transferirse a un tubo de microcentrifuga de 1,7 ml con tapa a rosca. Durante la transferencia con la pipeta hay que tener cuidado de no cortar las células. Las células se centrifugan a 1500 rpm, el PBS se elimina y la etapa de lavado con PBS se repite por segunda vez. La biblioteca purificada y/o pre-aclarada puede usarse inmediatamente para las células resuspendidas cuidadosamente. Los tubos pueden sumergirse en un baño enfriado con hielo y hacer girar durante 2 horas. Se centrifuga a 1500 rpm y se desecha el sobrenadante. Las células pueden lavarse 4 veces con PBS 1 ml, centrifugarse a 1500 rpm y desecharse el sobrenadante. Las células pueden resuspenderse en 500 µl de PBS. Si se desea, se cuenta hasta el 20% de células y último lavado.

20

J: Recuperación de rendimiento de biblioteca

25 A las células resuspendidas pueden añadirse 5 µl de RNasa H (2 U/µl) e incubarse a 37 °C durante 20 minutos. Esto producirá la digestión del ARN y liberará el ADNc de la superficie celular. Las células pueden centrifugarse a 1500 rpm durante 30 segundos y el sobrenadante transferirse a un tubo nuevo. Las células pueden desecharse. Pueden añadirse 5 µl de RNasa A (20 mg/ml) al sobrenadante e incubarse a 37 °C durante 30 minutos. Esto degrada cualquier ARN celular que pueda haber procedente de células destruidas durante el proceso de selección. El ADN degradado puede retirarse después por diálisis y así se impide la interferencia con la amplificación de la biblioteca por PCR. Al sobrenadante se añade el mismo volumen de fenol/CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílico (25:24:1) y se somete a agitación vorticial durante 30 segundos. La fase orgánica inferior puede separarse de la fase acuosa superior por centrifugación en tubos de 2 ml Phase Lock Gel Heavy (Eppendorf) a velocidad máxima durante 5 minutos. La fase acuosa superior puede transferirse a un tubo nuevo y la extracción se repite una vez con fenol/CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con CHCl<sub>3</sub>. La fase acuosa superior después de la extracción con CHCl<sub>3</sub> puede transferirse a un Kit de Mini Diálisis, límite de 8 kDa, 2 ml (GE healthcare) y dializarse durante una noche a 4 °C frente a 4 litros de dH<sub>2</sub>O.

35

K: Recuento y cálculo de la recuperación de selección de bibliotecas

40 Comenzando desde la Ronda 3 se realiza el recuento del 10 - 20% del último lavado y de las células.

40

$$\% \text{ de recuperación de selección} = 100 \times \text{CPM}_{\text{Células Totales}} / \text{CPM}_{\text{Producción Total}}$$

### 18. Reamplificación de ADN de la biblioteca por RT-PCR

45 La transcripción inversa puede realizarse usando el material capturado de la biblioteca. Los reactivos y los protocolos conocidos en la técnica son adecuados para llevar a cabo la reacción de transcripción inversa. El volumen de la reacción puede aumentarse o disminuirse de acuerdo con el volumen de las perlas después de la selección.

50 Los cebadores usados para la transcripción inversa pueden ser cualquiera de las secuencias inversas complementarias adecuadas localizadas en la región invariable del extremo 3' de la biblioteca de anticuerpos y pueden ser los mismos o además en dirección 3' con respecto al cebador inverso a usar en una PCR de amplificación posterior.

55 Una reacción de transcripción inversa ejemplar contiene las perlas de la selección de bibliotecas (en agua), cebador inverso y dNTP. Las reacciones se incuban a 65 °C durante aproximadamente 5 minutos y se enfrían en hielo. Después a la reacción se añaden típicamente tampón de síntesis de primera cadena, DTT a aproximadamente 0,1 M e inhibidor de RNasa. Las reacciones de transcripción inversa se incuban a aproximadamente 42 °C durante 2 minutos antes de añadir la enzima transcriptasa inversa. Las reacciones se incuban a aproximadamente 42 °C durante 50 minutos con agitación ocasional. Después, las reacciones se incuban a 95 °C durante 5 minutos. Después las perlas se recogen con un imán, y el sobrenadante se transfiere a nuevos tubos, y se agrupa si procede del mismo resultado de selección. Las perlas se resuspenden en agua (la mitad del volumen de la RT), y se incuban en tubos a 95 °C durante 5 minutos. Las perlas se recogen de nuevo usando un imán, y el sobrenadante se agrupa con el sobrenadante previamente transferido. Esto contiene el molde de ADNc para la amplificación por PCR del resultado de selección. Después de la PCR, se cargan 10 µl de producto PCR sobre un gel de agarosa al 2% para confirmar que la reacción se ha producido satisfactoriamente.

65

19. PCR para realizar la amplificación del molde de ADN de la biblioteca

Para resultados de selección de la primera y segunda ronda, el ADNc (sobrenadantes de reacciones RT) puede dializarse contra agua usando un límite de 8 kDa y puede usarse toda la cantidad de ADNc como molde para la PCR. Para resultados de selección de rondas posteriores, puede usarse típicamente el 10% de ADNc como molde para la PCR, y la diálisis no es típicamente necesaria. Las reacciones pueden realizarse en volúmenes de PCR de 1 ml para resultados de la ronda 1 y 2 (usando todos los productos de la RT), mientras que los volúmenes de reacción pueden aumentarse para resultados de rondas posteriores. Deben prepararse alícuotas para reacciones de 100 µl a partir de una mezcla maestra. En la Tabla 2 siguiente se muestra una reacción de PCR ejemplar por amplificación del molde de ADN de la biblioteca.

**Tabla 2:** Reacción de PCR ejemplar por amplificación del molde de ADN de la biblioteca

Molde de ADN	X µl
Añadir dH <sub>2</sub> O hasta	740 µl
Tampón KOD 10X	100 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	60 µl
dNTP 10 mM	20 µl
Cebador directo 5' (10 µM)	30 µl
Cebador inverso 3' (10 µM)	30 µl
ADN Polimerasa KOD Hot Start	20 µl
Volumen total	1000 µl*

En una realización ejemplar, se usan reacciones PCR de 1 ml para resultados de ronda 1 y 2 y se usan reacciones de 0,5 ml para resultados de rondas posteriores. Deben prepararse alícuotas de reacciones de 100 µl a partir de una mezcla maestra. En la Tabla 3 siguiente se muestran las condiciones de ciclados térmicos ejemplares para la amplificación del molde de ADN de la biblioteca.

20 **Tabla 3:** Reacción PCR alternativa ejemplar para la amplificación del molde de ADN de la biblioteca

Molde de ADNc	X µl
dH <sub>2</sub> O	añadir hasta 790 µl
Tampón Taq ADN Polimerasa de Alta Fidelidad 10X	100 µl
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	40 µl
dNTP 10 mM	20 µl
Cebador directo 5' (10 µM)	20 µl
Cebador inverso 3' (10 µM)	20 µl
Taq ADN Polimerasa de Alta Fidelidad	10 µl
Volumen total	1000 µl

En una realización ejemplar, se usan reacciones PCR de 1 ml para resultados de ronda 1 y 2 y se usan reacciones de 0,5 ml para resultados de rondas posteriores. A partir de una mezcla maestra deben prepararse alícuotas de 100 µl. En la Tabla 4 siguiente se muestran las condiciones de ciclados térmicos ejemplares para la amplificación del molde de ADN de la biblioteca.

**Tabla 4:** Otra reacción PCR alternativa ejemplar para la amplificación del molde de ADN de la biblioteca

Molde de ADN	X µl
dH <sub>2</sub> O	añadir hasta 660 µl
Tampón KOD 10X	100 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	60 µl
dNTP 2 mM	100 µl
Cebador directo 5' (10 µM)	30 µl
Cebador inverso 3' (10 µM)	30 µl
ADN Polimerasa KOD Hot Start	20 µl
Volumen total	1000 µl*

30 Condiciones de ciclado térmico para la amplificación del molde de ADN de la biblioteca

95 °C	2 minutos	
	↓	
95 °C	20 segundos }	20 ciclos*
55 °C	10 segundos }	
70 °C	15 segundos }	
	↓	

70 °C	30 segundos	
	↓	
4 °C	Mantener siempre	

\*Observación: típicamente pueden usarse de 18 a 20 ciclos de amplificación con ADN Polimerasa KOD Hot Start, sin embargo, solo 13 ciclos pueden ser satisfactorios para amplificar una cantidad suficiente de ADN de biblioteca. Productos no específicos de diversos tamaños pueden hacerse más evidentes con ciclos de amplificación adicionales, y el producto puede requerir purificarse con gel. Si es posible, puede ser útil aumentar la entrada de molde de ADN en lugar del número de ciclos de amplificación.

**Tabla 5:** Condiciones de ciclado térmico para la amplificación del molde de ADN de la biblioteca

94 °C	2 minutos	
	↓	
94 °C	20 segundos }	25 ciclos*
55 °C	20 segundos }	
68 °C	1 minuto }	
	↓	
68 °C	5 minutos	
	↓	
4 °C	Mantener siempre	

\*Observación: típicamente 25 ciclos proporcionan suficiente amplificación pero para obtener más productos puede aumentarse hasta tanto como 35 ciclos. Con ciclos de amplificación adicionales, productos no específicos de diversos tamaños pueden hacerse más evidentes y el producto puede precisar purificarse con gel. Si es posible, puede ser útil para aumentar la entrada de molde ADN en lugar del número de ciclos de amplificación.

Después de la PCR, el tamaño del producto PCR se confirma, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa. Si los productos tienen el tamaño correcto (~ 850 pb para scFv, ~ 500 pb para la biblioteca de VH o VL) y se presentan productos inespecíficos mínimos, los productos pueden usarse generalmente bien directamente en la reacción de transcripción de la siguiente ronda, o después de la purificación con una columna de centrifugación (por ejemplo Kit de Purificación PCR QIAquick de Qiagen™). En algunos casos, los productos PCR pueden requerir purificarse con gel. Si va a usarse la purificación con gel para productos PCR, se separan todos los productos restantes sobre un gel de agarosa preparativo y se corta la banda específica para la extracción con gel. La cuantificación de ADN purificado con gel puede ser confusa, ya que el EtBr residual en el ADN tiende a interferir con la absorbancia UV. Una etapa de lavado más amplia durante la extracción con gel puede ayudar a aliviar esta interferencia. Si fuera posible, la concentración de ADN debe medirse en un espectrofotómetro, ya que las trazas de barrido UV son muy diferentes entre una muestra de ADN limpia y un ADN con EtBr residual. Este protocolo se repite posteriormente para realizar rondas de selección múltiples.

A: Espectrotipificación por PCR de la CDR3 VH

Para analizar las distribuciones de tamaño de la CDR3 VH en la biblioteca, o sus resultados de selección, puede usarse espectrotipificación por PCR. Se trata de una herramienta útil para evaluar la diversidad de las bibliotecas, así como el avance de las selecciones. Las pocas rondas iniciales de los resultados de la selección de las bibliotecas y de la biblioteca antes de la selección deben ser muy diversas y la distribución del tamaño de la CDR3 se aproxima a una distribución Gaussiana.

**Tabla 6: Cebadores de espectrotipificación por PCR**

6-FAM-PanVHFR3-Fwd	GACACGGCCGTGTATTACTGT
PanJH-Rev	GCTGAGGAGACGGTGACC

Preparación de espectrotipificación por PCR

Molde de ADNc	2,0 µl
dH <sub>2</sub> O	18,1 µl
Tampón de reacción GoTaq Flexi 5X	6,0 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,8 µl
dNTP 10 mM	0,6 µl
Cebador directo 5' (10 µM)	0,6 µl
Cebador inverso 3' (10 µM)	0,6 µl
GoTaq Flexi ADN polimerasa	0,3 µl
<b>Volumen total</b>	<b>30,0 µl</b>

En esta preparación se usó GoTaq ADN polimerasa de Promega pero puede sustituirse por ADN polimerasas termoestables de otras fuentes. La concentración final de Mg<sup>2+</sup> es 1,5 mM.

**Programa de ciclado térmico**

94 °C 2 minutos  
 ↓  
 94 °C 20 segundos }  
 55 °C 20 segundos } 30 ciclos\*  
 72 °C 30 segundos }  
 ↓  
 72 °C 5 minutos  
 ↓  
 4 °C Mantener siempre

**B: Electroforesis y análisis por espectrotipificación**

Después de la PCR, para confirmar el éxito de la reacción pueden cargarse 10 µl de producto en un gel de agarosa al 2% y el producto restante puede remitirse a una instalación central se secuenciación por electroforesis y espectrotipificación en una secuenciadora, junto con un marcador de tamaño de ADN marcado con ROX, que generalmente subestima el tamaño del producto de ADN a 3 pb, posiblemente debido a la diferencia en los colorantes de marcación.

10 El producto de ADN amplificado tiene la siguiente organización:

5'-FR3 (27 pb)-VH CDR3-FR4 (35 pb)-3'

El tamaño de VH CDR3 se deduce del tamaño del producto de ADN aparente, determinado por el marcador de tamaño colorante Rox mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Tamaño}_{\text{VH CDR3}} = (\text{Tamaño}_{\text{Tamaño del producto de ADN aparente}} - 60) / 3$$

Donde 60 = (62<sub>Armazones en ambos extremos</sub> - 1<sub>saliente A en 3'</sub> + 3<sub>subestimación del marcador de ADN</sub>)

16. *Reactivos ejemplares y composiciones del tampón*

**Tampón de ligamiento químico 10X**

Tris, pH 7 250 mM  
 NaCl 1 M

**Tampón de unión oligo-dT 1X 2X 3X**

Tris, pH 8 100 200 300 mM  
 NaCl 1 2 3 M  
 Tritón X-100 0,05 0,1 0,15%

**Tampón de unión FLAG 1X 5X**

Tampón basado en fosfato  
 PBS 1X 5X  
 Tritón X-100 0,025 0,125%  
 Tampón alternativo basado en HEPES  
 HEPES 50 250 mM  
 NaCl 150 750 mM  
 Tritón X-100 0,025 0,125%

**Tampón de selección**

Tampón basado en fosfato  
 PBS 1X  
 BSA 1 mg/ml  
 ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml  
 Tritón X-100 0,025%  
 ARNt de levadura (opcional, añadir antes del uso) 20 ng/ml

**Tampón alternativo basado en HEPES**

HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
BSA	1 mg/ml
ADN de esperma de salmón	0.1 mg/ml
Tritón X-100	0,025%
ARNt de levadura (opcional, añadir antes del uso)	20 ng/ml

**Tampón de primera cadena**

Tris-HCl, pH 8,3	250 mM
KCl	375 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM

**Solución madre FLAG 50X**

Péptido FLAG	25 mg
Tampón de selección	5 ml

Preparar alícuotas de 1 ml y conservar a -20 °C.

**Solución de elución FLAG**

Solución madre FLAG 50X	1 ml
Tampón de selección	49 ml

Preparar alícuotas de 1 ml y conservar a -20 °C

**5 Preparación de oligo-dT celulosa**

Pesar 2,5 g de oligo-dT celulosa en un tubo de 50 ml.

Añadir 25 ml de NaOH 0,1 N y mezclar.

10

Centrifugar a 1500 rpm durante 3 minutos, desechar el sobrenadante. Lavar la oligo-dT celulosa con 25 ml de tampón de unión Oligo-dT 1X. Centrifugar a 1500 rpm durante 3 minutos, desechar el sobrenadante. Repetir el lavado 3 veces más y medir el pH del sobrenadante. El pH debe ser igual al del tampón de lavado (~ pH 8,5). Resuspender la oligo-dT celulosa a un volumen final de 25 ml añadiendo tampón de unión Oligo-dT 1X. Esto puede ser aproximadamente una suspensión del 50%. Conservar la perlas de celulosa prelavadas a 4 °C.

15

Concentración final = 100 mg/ml = capacidad de ARN 1 nmol.

**Preparación de anti-FLAG M2 agarosa**

20

Transferir 25 ml de perlas M2 agarosa en un tubo de 50 ml. Centrifugar las perlas durante 5 minutos a 1000 rpm en una centrífuga Beckman y retirar el sobrenadante por aspiración. Lavar resuspendiendo las perlas en un mismo volumen de glicina 10 mM, pH 3,5.

25

Centrifugar las perlas durante 5 minutos a 1000 rpm en un centrífuga Beckman y retirar el sobrenadante por aspiración. Resuspender con un volumen de columna de tampón de unión FLAG 1X. Centrifugar la suspensión durante 5 minutos a 1000 rpm en una centrífuga Beckman y retirar el sobrenadante por aspiración.

Repetir el lavado 3 veces.

30

Resuspender con un volumen de columna de tampón de unión 1X (que contiene BSA 1 mg/ml y ADN de esperma de salmón 100 mg/ml). Mover durante 1 hora o durante una noche a 4 °C.

Separar alícuotas en fracciones de 2 ml si se desea y guardar a 4 °C.

35

**EJEMPLO 1**

**DEMOSTRACIÓN DE MOLÉCULAS DE ARNm-scFv FUNCIONALES**

40

Se utilizaron cuatro anticuerpos conocidos para demostrar que las moléculas de ARNm-scFv funcionales podían presentarse y unirse a su antígeno respectivo: D2E7 (anti-hTNF humano), Y61 (anti-hIL-12 humano), 17/9 (anti-HA de ratón) y MAK195 (anti-hTNF de ratón). El MAK-195 scFv se generó por PCR a partir de ADN plasmídico usando los cebadores mostrados en la siguiente Tabla 7.

**Tabla 7: Cebadores oligonucleotídicos usados para la construcción de construcciones MAK195 ARNm-scFv**

Cebadores	Secuencias
T7-MAK195VH-Fwd (Directo)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTT ACAATTACACCATGGAGGTGCAGCTGAAGGAG TCAGG (SEC ID N°: 22)
MAK195VhGS-Rev (Inverso)	CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT CC (SEC ID N°: 23)
MAK195VLGS- Fwd (Directo)	GGTGGAGGCGGTTTCAGGCCGAGGTGGCTCTGG CGGTGGCGGATCGGACATTGTGATGACCCAGTC TC (SEC ID N°: 24)
MAK195VL- Rev (Inverso)	GATGGTGCAGCCACCGTACGTTTTATTTC AAC TTTGTCCCGAG (SEC ID N°: 25)

5 Se generó un anti-HA 17/9 scFv (véase Schulze-Gahmen et al. (1993) J. Mol. Biol. 234(4): 1098-118) por PCR usando los siguientes cebadores en base a secuencias de proteína A31790 y B31790 descargadas de las bases de datos del NCBI (véase la Tabla 10 más adelante).

**Tabla 8: Cebadores oligonucleotídicos usados para la construcción de construcciones 17/9 ARNm-scFv**

Cebadores	Secuencias
T7TMVUTR-17/9 VH-1 Fwd	GGACAATTACTATTTACAATTACACCATGGAAG TGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGATCTGGTG AAACC (SEC ID N°: 26)
17/9 VH-2 Rev	GCTGCTAAAGCTAAAGCCGCTCGCCGCGCAGCT CAGTTTCAGGCTGCCGCCCGGTTTCACCAGATC GCCG (SEC ID N° 27)
17/9 VH-3 Fwd	GGCTTTAGCTTTAGCAGCTATGGCATGAGCTGG GTGCGCCAGACCCCGGATAAACGCCTGGAATG GGTGG (SEC ID N°: 28)
17/9 VH-4 Rev	GCCTTTCACGCTATCCGGATAATAGGTATAGCC GCCGCCGTTGCTAATGGTCGCCACCCATTCCAG GCGT (SEC ID N°: 29)
17/9 VH-5 Fwd	CCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGC CGCGATAACGCGAAAAACACCCTGTATCTGCAG ATG (SEC ID N°: 30)
17/9 VH-6 Rev	GTTCGCGGCGCGCGCAATAATACATCGCGCTAT CTTCGCTTTTCAGGCTGCTCATCTGCAGATACA GGGT (SEC ID N°: 31)

Cebadores	Secuencias
17/9 VH-7 Fwd	ATTGCGCGCGCCGCGAACGCTATGATGAAAAC GGCTTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTG ACCGT (SEC ID N°: 32)
17/9 VH-8 GS Rev	CGATCCGCCACCGCCGCTGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCCGCGCTCACGGTCACCAGGGT GCCC (SEC ID N°: 33)
GS-17/9 VL-1 Fwd	AGCGGCGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACC CAGAGCCCGAGCAGCCTGACCGTGACCGCGGG CGAAA (SEC ID N°: 34)
17/9 VL-2 Rev	TGTTTGCCGCTGTAAACAGGCTCTGGCTGCTG GTGCAGCTCATGGTCACTTTTTCGCCCGCGGTC ACGG (SEC ID N°: 35)
17/9 VL-3 Fwd	GTTTAACAGCGGCAAACAGAAAACTATCTGA CCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGCCGCCG AAAGTG (SEC ID N°: 36)
17/9 VL-4 Rev	CGGTAAAGCGATCCGGCACGCCGCTTTCGCGGG TGCTCGCCAATAAATCAGCACTTTCGGCGGCT GGCC (SEC ID N°: 37)
17/9 VL-5 Fwd	TGCCGGATCGCTTTACCGGCAGCGGCAGCGGCA CCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCGTGCAGG CGGA (SEC ID N°: 38)
17/9 VL-6 Rev	AAAGGTCAGCGGGTTGCTATAATCGTTCTGGCA ATAATACACCGCCAGATCTTCCGCCTGCACGCT GCTA (SEC ID N°: 39)
17/9 VL-7 Fwd	AGCAACCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCACCAAA CTGGA ACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT GTCT (SEC ID N°: 40)
17/9 VL-8 FLAG Rev	TTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTT GTAGTCGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACC (SEC ID N°: 41)

La secuencia del anticuerpo 17/9 se obtuvo de la base de datos del NCBI usando los números de registro A31790 y B31790.

- 5 Las construcciones de ADN para estos scFv se transcribieron *in vitro* y después se tradujeron por lisado de reticulocitos de conejo bien como ARNm-scFv (la proteína estaba unida al ARNm mediante un conector con modificación usando puromicina) o como scFv libre (la proteína no estaba unida a ARNm). Ambos tipos de moléculas se purificaron y se sometieron a ensayos de interacción (pull-down) con antígenos marcados con biotina correspondientes (véase la Figura 4).

Los datos mostrados en la Figura 4 muestran que el ARNm-scFv funcional (unido a antígeno marcado con biotina) puede interactuar con perlas magnéticas de estreptavidina, aunque a un porcentaje de recuperación más bajo que el scFv libre. Experimentos adicionales mostraron que esta diferencia se debía simplemente al ARN pesado en contacto con el scFv. La degradación con RNasa de la parte de ARN de la molécula ARNm-scFv restableció la recuperación de scFv con antígeno al mismo nivel que el del scFv libre (véase la Figura 5).

**EJEMPLO 2**

**OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE ARNm PARA MEJORAR LA REACCIÓN DE TRADUCCIÓN**

En una realización preferida, el tamaño de la biblioteca es de  $1 \times 10^{12}$ . Aproximadamente se requieren 20 pmol de la proteína fusionada (por ejemplo,  $1,2 \times 10^{13}$ ) para la selección con objeto de cubrir 12 veces el tamaño de biblioteca. La recuperación después de la purificación con FLAG es típicamente de aproximadamente 30%. Por lo tanto, después de la purificación con Oligo-dT se necesitan aproximadamente 60 pmol de la proteína fusionada para la entrada en la purificación con FLAG. En una realización, se obtienen aproximadamente 1,2 pmol de proteína fusionada por 100 pmol de ARN después de purificación con Oligo-dT. En esta realización, se necesitan aproximadamente 5 nmol de ARN (que cubre 3000 veces el tamaño de la biblioteca) para obtener 60 pmol de proteína fusionada. Obsérvese que este cálculo no tiene en cuenta la observación de que solo aproximadamente el 20-30% de las moléculas de presentación de ARN fusionadas son funcionales (pueden recuperarse después de la selección).

Debido a la cantidad anteriormente mencionada de la proteína fusionada necesaria para etapas posteriores del método de presentación de ARNm, la reacción de traducción se optimizó para maximizar la recuperación de proteína. La modificación de la cantidad inicial de entrada de ARN en la reacción de traducción se evaluó después de purificación con FLAG. La recuperación de proteína se evaluó midiendo el porcentaje de  $S^{35}$  metionina incorporada durante la reacción de traducción y calculando la proporción de pmol de proteína (salida) con respecto a pmol de ARN (entrada). Las cantidades de partida del ARN de entrada ensayadas, así como la recuperación de proteína resultante, se muestran en la Tabla 9. Como se demuestra con este análisis, una menor entrada de ARN conduce sorprendentemente a un mayor porcentaje de recuperación de proteína.

**Tabla 9: Relación entre entrada de ARN y recuperación de proteína**

Entrada de ARN en la traducción (para 1 vial de lisado)	Después de purificación con FLAG	
	% de $S^{35}$ Met incorporada	pmol de Proteína/pmol de ARN
400 pmol	0,40%	1/400 = 0,25%
200 pmol	0,67%	1,7/200 = 0,85%
100 pmol	0,99%	2,5/100 = 2,5%
50 pmol	0,76%	1,9/50 = 3,8%
25 pmol	0,73%	1,8/25 = 7,2%

La reacción de traducción también se realizó usando diferentes cantidades de la mezcla de aminoácido libre para determinar el efecto sobre la recuperación de proteína. Las cantidades de partida relativas de la mezcla de aminoácidos ensayada, así como la recuperación de proteína resultante, se muestran en la Tabla 13. La entrada de ARN en cada caso fue de 50 pmol. Como demuestra este análisis, el aumento del conjunto de aminoácidos conduce a disminuir la eficacia de la traducción.

**Tabla 10: Relación entre concentración de aminoácidos y recuperación de proteína**

Mezcla de aminoácidos	Después de purificación con FLAG	
	% de $S^{35}$ Met incorporada	pmol de Proteína/pmol de ARN
1x	1,60%	2/50 = 4%
2x	0,42%	0,5/50 = 1%
3x	0,13%	0,77/50 = 0,3%
4x	0,03%	0,04/50 = 0,07%

También se ensayaron diferentes cantidades de metionina “fría” (es decir, no-radioactiva) con respecto a su efecto sobre la eficacia de la traducción. Las diferentes concentraciones de metionina fría que se ensayaron así como la recuperación de proteína resultante se muestran en la Tabla 14. La salida de ARN en cada caso fue de 50 pmol. Como demuestra este análisis, el aumento de la entrada de metionina fría no conduce a un aumento en la eficacia de la traducción.

5

**Tabla 11: Relación entre concentración de metionina fría y recuperación de proteína**

Concentración de Metionina Fría	Después de purificación con FLAG	
	% de S <sup>35</sup> Met incorporada	pmol de Proteína/pmol de ARN
5 µM	1,00%	1,31/50 = 2,6%
17,5 µM	0,23%	1,15/50 = 2,3%
30 µM	0,20%	1,52/50 = 3,0%
42,5 µM	0,15%	1,58/50 = 3,2%

La entrada de ARN y la concentración de aminoácidos deben por tanto tenerse en cuenta cuando se planifica la reacción de traducción para presentación de ARNm. Aunque la disminución de la entrada de ARN en cada reacción puede mejorar la recuperación de proteína, esto también puede influir sobre el tamaño de la biblioteca. En la Tabla 12 se muestra una reacción de traducción de ARN ejemplar que puede ser útil en la realización práctica del método de presentación de ARNm de la presente invención.

10

15

**Tabla 12: Reacción de traducción de ARN ejemplar**

ARN transcrito <i>in vitro</i>	100 pmol = 29-36 µg
Mezcla de traducción (incluyendo mezcla de aminoácidos, sin incluir metionina)	15 µl
<sup>35</sup> S Metionina	2 µl
Lisado de reticulocitos	200 µl
GSSG 100 mM/GSH 10 mM	3,3 µl
PDI (1 U/µl)	6 µl
H <sub>2</sub> O	hasta 300 µl
Condiciones de reacción	30 °C durante 60-90 minutos

### EJEMPLO 3

#### OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE ARNm POR SELECCIÓN DE scFv - LONGITUD ESPACIADORA

20

Previamente se había propuesto que una longitud espaciadora larga entre la proteína scFv y el extremo del ARNm mejoraría el plegamiento y la función de scFv (véase Hanes et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (10): 4937-42). Por consiguiente, se investigó el efecto de la longitud espaciadora entre el scFv y el sitio de hibridación del conector sobre la función y el rendimiento de la molécula ARNm-scFv (véase la Figura 6). Se prepararon tres construcciones diferentes de D2E7 scFv con espaciadores corto, medio y largo en dirección 3' y dos construcciones espaciadoras corta y larga para Y61 y 17/9 scFv (véase la Figura 8 para construcciones espaciadoras de D2E7). Los resultados, representados en la Figura 7, muestran que un espaciador más largo no proporciona ventajas medibles en la función de la molécula ARNm-scFv, evaluado por unión a antígeno. Además, una longitud espaciadora más larga reduce significativamente el rendimiento de ARNm-scFv (véase la Figura 7). Los rendimientos de ARN también fueron menores con un espaciador más largo: el espaciador corto produjo 6 nmol de ARN, el espaciador medio produjo 3,4 nmol de ARN y el espaciador largo produjo 1,7 nmol. Por lo tanto, en una realización, para la construcción de una biblioteca de scFv se prefiere un espaciador corto.

25

30

35

La comparación de diferentes espaciadores y conectores también se realizó usando tres construcciones de Y61 diferentes (véase la Figura 23). Los resultados, mostrados a continuación en la Tabla 13, muestran que los rendimientos de ARN fueron también menores con un espaciador más largo. Además, no hubo diferencias en las purificaciones de la molécula de ARNm ni unión a antígeno desplazando la cola poli-A desde el propio ARNm (Y61-scGene3pA) al conector de ADN entre el ARNm y la proteína scFv (Y61-scGene3) ya que la proteína scFv es idéntica entre estas dos construcciones como se muestra en la SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 4, respectivamente

40

Tabla 13: Comparación de diferentes espaciadores y conectores

Construcción	Porcentaje de recuperación		
	Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	IL-12 (selección 50 nM)
Y61-scCL-corta	1,00%	51,3%	21,1%
Y61-scGene3	0,46%	50,3%	8,0%
Y61-scGene3pA	0,45%	47,4%	6,1%

Como se muestra más adelante, 17/9 requiere PDI durante la traducción para ser funcional, y se observó que el DTT en la reacción de transcripción inversa antes de la selección influía sobre su unión al antígeno. Como estos resultados indican, los enlaces disulfuro son esenciales para la función de 17/9, y esto hace que 17/9 sea un buen candidato para investigar los requisitos de la longitud espaciadora. La Figura 9 muestra que, aunque una longitud espaciadora más larga no mejora la unión de la molécula ARNm-scFv con el antígeno, si reduce su rendimiento.

#### EJEMPLO 4

##### OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE ARNm PARA MEJORAR EL PLEGAMIENTO DE LA PROTEÍNA scFv Y FUNCIÓN-OMISIÓN DE MODIFICACIÓN QUÍMICA SOBRE RESTOS DE CISTEÍNA

La tecnología de presentación de ARN mensajero en la técnica incluye una reacción de protección química sobre restos de cisteína libres para impedir la formación de enlaces disulfuro de cisteína no deseables por ácido 2- nitro- 5- tiocianatobenzoico, que produce cianilación, o por N-etilmaleimida, que se une covalentemente al grupo sulfhidrilo. Aunque esta reacción de protección elimina la posibilidad de plegamiento erróneo de la proteína, ocasionado por entrecruzamiento al azar de los restos de cisteína libres, la presente invención elimina la conservación artificial de la cisteína libre dentro de un anticuerpo, lo cual puede ser un perjuicio para su futura factibilidad de fabricación debido a propiedades físicas o químicas imprevisibles. La etapa de protección química se eliminó de tal manera que durante la selección de bibliotecas no se conservó de manera activa cualquier cisteína libre extra por encima de las cuatro cisteínas necesarias para el plegamiento del dominio scFv de Ig.

#### EJEMPLO 5

##### OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE ARNm PARA MEJORAR EL PLEGAMIENTO Y LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA scFv - NECESIDAD DE UNA ACTIVIDAD DE PROTEÍNA DISULFURO ISOMERASA CO-TRADUCCIONAL

Se ha sugerido que la PDI contribuye a mejorar la función y la secreción de proteínas por actividad isomerasa o chaperona o ambas (véase Shusta et al. Nat Biotechnol 16 (8): 773- 7; Smith et al. Biotechnol Bioeng 85 (3): 340- 50). Por cada secuencia scFv se codifican dos enlaces disulfuro intradominio de Ig, uno en el dominio VH y el otro en el dominio VL. Se ha sugerido que una actividad de proteína disulfuro isomerasa (PDI) co-traduccional es crucial para la correcta formación de enlaces disulfuro *in vitro* (véase Ryabova et al. Nat Biotechnol 15 (1): 79- 84). Los protocolos de presentación de ARNm en la técnica han estipulado la inclusión de (PDI) en la reacción de traducción.

Para ensayar su necesidad de actividad PDI en el sistema de presentación de ARNm se usaron scFv de D2E7, Y61 y 17/9. Los resultados mostraron que dos de los scFv (D2E7 y 17/9) no se unirían a su antígeno afín sin PDI durante su generación, mientras que Y61 pareció no verse afectado (véase la Figura 10). Se llegó a la conclusión de que, para garantizar una función de scFv máxima, a un gran nivel de bibliotecas de anticuerpos, de alta diversidad, se necesitaría actividad PDI.

También se ensayó la recuperación y la funcionalidad de scFv de D2E7 traducido con o sin PDI adicional añadida. La reacción de traducción incluyó 1 tubo de lisado (200 µl), ARN espaciador corto D2E7 100 pmol, PDI y GSSG/GSH. La traducción sin PDI excluyó PDI y GSSG/GSH. La proteína traducida se recuperó mediante purificación con FLAG y la cantidad recuperada se cuantificó. Después, se realizó la recuperación/unión a antígeno con TNF $\alpha$  marcado con biotina 50 mM e iguales entradas para cada uno, 100000 cpm. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 14.

Tabla 14: Ensayo de scFv D2E7 +/- PDI

Traducción	Recuperación con FLAG (cpm)	Recuperación con FLAG (% de entrada)	Recuperación de Unión a Antígeno
D2E7 + PDI	290000 cpm	1,6%	25%
D2E7 - PDI	460000 cpm	2,5%	4%

Los resultados que muestran que Y61 no requiere PDI durante la traducción para su funcionalidad se muestran en la siguiente Tabla 15.

**Tabla 15: Y61-Sccl-Corto no requiere PDI durante la traducción para su funcionalidad**

PDI	RT	% de Recuperación		
		Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	Selección con IL-12 (50 nM)
No	No	0,57%	34,0%	18,9%
No	Sí		9,2%	20,8%
Sí	No	0,50%	31,9%	24,3%
Sí	Sí		9,8%	22,7%

5 Los resultados que muestran que 17/9 requiere PDI durante la traducción para su funcionalidad se muestran en la siguiente Tabla 16.

**Tabla 16: 17/9 requiere PDI durante la traducción para su funcionalidad**

	PDI	% de Recuperación			
		Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	Selección con HA (50 nM)	Selección sin Ag
Proteína libre	No	N/D	N/D	3,3%	N/D
	Sí			30,5%	0,7%
Proteína ligada	No	3,4%	27,6%	2,3%	N/D
	Sí	2,5%	39,3%	12,4%	0,8%

10 **EJEMPLO 6**

**OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE ARNm PARA MEJORAR EL PLEGAMIENTO Y LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA scFv - ELIMINACIÓN DE DITIOREITOL DE LA REACCIÓN**

15 El ditiotreitól (DTT) es un agente reductor que normalmente se introduce en las reacciones enzimáticas para minimizar la agregación de proteínas y reducir la oxidación de las mismas. También se usa típicamente en la reacción de transcripción inversa (RT, *Reverse Transcription*) después de la etapa de traducción *in vitro* de las moléculas de ARNm de scFv. Dado que su inclusión puede reducir los dos enlaces disulfuro intracatenarios en una molécula scFv, que se producen por actividad PDI, se investigó el posible efecto del DTT sobre la función de unión de scFv al antígeno (véase la Figura 11). La presencia de DTT anuló significativamente la actividad de unión de scFv de 17/9 al antígeno después de la RT, lo que está en consonancia con la dependencia de actividad PDI para la función de 17/9 mostrada en la Figura 11. Esta pérdida de actividad de unión al antígeno no se debió a la propia reacción de RT, ya que la mayor actividad de unión al antígeno de 17/9 se conservaba si el DTT se omitía de la RT. Además, los resultados mostraron que de hecho se realizaba la transcripción inversa del ADNc de scFv de 17/9, a partir del ARNm en ausencia de DTT por PCR, lo que sugería que el DTT es dispensable para la reacción de RT (datos no mostrados).

30 En la siguiente Tabla 17 se observan los resultados que muestran que el DTT en la reacción de RT antes de la selección influye en la funcionalidad de 17/9. Sin embargo, como se muestra en la Figura 12, el DTT no influye en el proceso de RT.

**Tabla 17: El DTT en la reacción de RT antes de la selección influye en la funcionalidad de 17/9**

PDI	RT	% de Recuperación			
		Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	Selección con HA (50 nM)	Selección sin Ag
No	No	3,4%	27,6%	2,3%	N/D
Sí	No	2,5%	39,3%	12,4%	0,8%
	Sí, sin DTT		14,2%	9,4%	N/D
	Sí, con DTT		9,9%	2,0%	N/D

A diferencia del scFv de 17/9, el DTT no influyó en la función del scFv del anti-IL-12 Y61 (véase la Figura 11). Esto está en consonancia con su insensibilidad mencionada anteriormente con respecto a la actividad PDI, y sugiere que no todos los scFv de anticuerpos requerirán enlaces disulfuro para su funcionamiento. Las diferentes condiciones de la RT exploradas para Y61-scCL corto y correspondientes resultados se muestran a continuación en la Tabla 18 y también en la Figura 13.

5

**Tabla 18: Diferentes condiciones de la RT para Y61-scCL-corto**

RT	DTT en la reacción de RT	RNasa OUT en la selección	% de Recuperación		
			Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	Selección con IL-12 (50 nM)
Antes de la selección	Sí	No	1,6%	25,9%	21,6%
Antes de la selección	No	No		29,3%	18,8%
Después de la selección	Sí	No		22,2%	
Después de la selección	Sí	Sí		56,1%	21,0%

En una realización, el DTT no está presente en la RT o, como alternativa, la RT se retrasa hasta después de la selección con antígeno para maximizar la producción del rendimiento de scFv funcional a partir de la biblioteca de ARNm-scFv. Las siguientes Tablas 19 y 20 muestran los resultados del retraso de la etapa de RT hasta después de la etapa de selección con antígeno para Y61-ScCL-largo e Y61-ScCL-corto, respectivamente.

10

**Tabla 19: Comparación de Y61-ScCL-largo con o sin la etapa de RT**

		Rendimiento de ARN	% de Recuperación			
			Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	Selección con IL-12 (50 nM)	Selección sin Ag
<b>Proteína libre</b>		3,2 nmoles	N/D		49,5%	0,3%
<b>Proteína ligada</b>	<b>Sin etapa de RT</b>		13%	57,6%	31%	0,2%
	<b>Con etapa de RT</b>			15%	28,6%	0,3%

15

**Tabla 20: Comparación de Y61-ScCL-corto con o sin etapa de RT**

		Rendimiento de ARN	% de Recuperación			
			Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	Selección con IL-12 (50 nM)	Selección sin Ag
<b>Proteína libre</b>		4,7 nmoles	N/D	N/D	40,2%	0,2%
<b>Proteína ligada</b>	<b>Sin etapa de RT</b>		0,55%	47,6%	20,8%	0,1%
	<b>Con etapa de RT</b>			19,3%	21,8%	0,1%

**EJEMPLO 7**

**20 OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE ARNm PARA MEJORAR EL PLEGAMIENTO Y LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA scFv - INCLUSIÓN DE INHIBIDOR DE RNASA DURANTE LA SELECCIÓN POR ANTÍGENO**

La producción de ARNm bicatenario-ADNc por RT se pensó para preparar a las moléculas de ARNm-scFv para la unión al antígeno para impedir la degradación de ARN y reducir estructuras secundarias de ARN. Después de la selección por antígeno, el ADNc puede recuperarse por hidrólisis alcalina del ARNm y sirve como molde de amplificación por PCR. Para impedir el posible impacto del DTT sobre la función de scFv por RT antes de la selección por antígeno, se requiere emplear métodos alternativos para proteger al ARNm de la amplificación

25

después de la selección.

Por lo tanto, se investigó si el ARNm, en una molécula de ARNm-VH, que carecía de su cadena de ADNc protectora sería suficientemente estable y accesible para amplificación por RT-PCR después de selección por antígeno. Como molécula patrón se usó una molécula de ARNm-VH de unión a IL- $\alpha$  previamente validada. La recuperación de la secuencia Phyls40 VH se comparó cuando la RT se realizó antes o después de la selección por antígeno (véase la Figura 14). En comparación con el método de la técnica (RT de pre-selección y elución alcalina del ADNc, carril izquierdo), la recuperación de ARNm por RT-PCR después de selección por antígeno, pareció estar significativamente reducida cuando el complejo ARNm-IL-1 $\alpha$  se capturaba sobre perlas magnéticas de SA y se usaba directamente para la RT (carril derecho). Esto podría deberse a la degradación parcial del ARN durante la selección por antígeno o a la mala accesibilidad del ARNm sobre las perlas para la RT. Intentos realizados para interrumpir la interacción de IL-1 $\alpha$ -Phyls40 VH y disociar la molécula de ARNm-VH de las perlas de SA por elución ácida (a pH 3) para mejorar la accesibilidad del ARNm parecieron empeorar su recuperación, posiblemente debido a la inestabilidad del ARNm reducida o a la mala disociación de la molécula de ARNm-VH de su antígeno en tampón de elución antes de eliminar los complejos con las perlas de SA. La Figura 14 muestra resultados de transcripción inversa después de selección por antígeno en comparación con el método de RT-PCR convencional después de oligoDT con elución ácida seguido de RT-PCR y RT-PCR directamente fuera de las perlas después de la captura. La dilución con perlas libres a 1:10, 1:100 y 1:1000 mostró que se conseguía una fuerte re-amplificación a una dilución de 1:1000.

Dado que es posible omitir la RT antes de la selección por antígeno y posteriormente recuperar el ARNm por RT-PCR, se investigó si la recuperación reducida del molde de ARNm podía reestablecerse o mejorarse protegiendo el ARNm de la actividad RNasa contaminante por inhibidor de RNasa. Se incluyó RNaseOUT™ (Invitrogen, cat. N° 10777-019) a una dilución 1:20 durante la etapa de selección por antígeno y seguido de RT-PCR para comparar la recuperación de ARNm (véase la Figura 15). En comparación con la realización de RT antes de la selección por antígeno, la recuperación del molde de ARNm de nuevo se reducía si la RT se realizaba después de la selección por antígeno sin inhibidor de RNasa. De manera interesante, la inclusión de inhibidor de RNasa para la selección por antígeno no solo restablecía la recuperación de ARNm sino que también la mejoraba significativamente. Por tanto, parece que esta mejora se debe, al menos en parte, a una mejor eficiencia de captura de una molécula de ARNm-scFv más ligera, ~280 kDa, en comparación con una molécula de ARNm-scFv más pesada, ~560 kDa, con el ADNc adicional.

La inclusión de RNaseOUT también se ensayó con una molécula de ARNm-scFv. La Figura 16 representa el experimento realizado para comparar Y61-CL-largo con Y61-CL-corto en presencia o en ausencia de RNaseOUT. Los resultados pueden observarse en la siguiente Tabla 21 así como en la Figura 17.

**Tabla 21: Comparación del espaciador CL-largo y CL-corto en presencia o en ausencia de RNaseOUT**

Construcción	RNaseOUT	% de Recuperación		
		Purificación con oligo dT	Purificación con FLAG	Selección con IL-12 (50 nM)
Y61-scCL-largo	No	0,22%	29,3%	27,7%
	Sí	0,25%	30,5%	33,8%
Y61-scCL-corto	No	0,64%	42,2%	47,2%
	Sí	0,59%	46,2%	49,4%

#### EJEMPLO 8

#### SELECCIÓN DE BIBLIOTECAS PARA scFv de 17/9

Para demostrar que una molécula de ARNm-scFv puede enriquecerse mediante diversas rondas de selección usando los métodos de presentación de ARNm descritos en el presente documento, se construyó una biblioteca de scFv con una diversidad de 25 por PCR solapante. Para crear la biblioteca de scFv, se mezclaron las mismas cantidades de fragmentos VH y VL de 17/9, D2E7, 2SD4, Y61 y MAK195 y se combinaron en una biblioteca de scFv con una diversidad máxima de 25 y se usó como se ha descrito anteriormente. Después, se seleccionó el scFv de 17/9 de esta biblioteca por péptido de etiqueta HA marcado con biotina. Después de la selección, se observó el enriquecimiento de 17/9 por clonación y PCR de colonias. En la Figura 18 se muestran los resultados que cuantifican el scFv de 17/9, antes y después de una ronda de selección con ARNm-scFv. Después de una ronda de selección contra el péptido HA todas las secuencias scFv recuperadas de la producción de la selección fueron las del scFv de 17/9.

**EJEMPLO 9****LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE ARNm PUEDE USARSE PARA DIFERENCIAR AGENTES DE UNIÓN A scFv CON DIFERENTE AFINIDAD**

5 Para determinar si la tecnología de presentación de ARNm, es decir, como se describe anteriormente, puede usarse para diferenciar agentes de unión a scFv con diferente afinidad, se prepararon quimeras entre D2E7 y 2SD4. 2SD4 es el precursor de scFv de D2E7 que presenta baja afinidad ( $KD \sim 200$  nM como proteína libre) por el  $TNF\alpha$ . La Figura 19 representa las quimeras.

10 Se realizó la titulación de las proteínas libres. La Figura 20a muestra el porcentaje de recuperación después de la unión al antígeno entre las diferentes quimeras, mientras que la Figura 20b representa el porcentaje de recuperación normalizado después de la selección por antígeno. Los resultados anteriores muestran que la tecnología de presentación de ARNm, como se describe en el presente documento, puede usarse para diferenciar agentes de unión con diferente afinidad.

**EJEMPLO 10****TERMOESTABILIDAD DE LAS MOLÉCULAS DE ARNm-scFv**

20 Para determinar la termoestabilidad de las moléculas de ARNm-scFv, se realizó la traducción de D2E7-scCk y de Y61-scCk y la purificación se realizó en formato ARNm-scFv, como se describe en el presente documento. Después, las moléculas de ARNm-scFv se incubaron a diferentes temperaturas durante 30 minutos antes de la selección por antígeno. En la Figura 21 se muestra el porcentaje de recuperación normalizado después de la selección por antígeno.

25 La Figura 22 muestra que el ARN puede recuperarse después del tratamiento, a alta temperatura, de las moléculas de ARNm-scFv. En este caso, se realizó RT-PCR en las perlas con moléculas de ARNm-scFv de Y61-scCl recuperadas.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un método de exploración de una biblioteca de presentación de ARN de anticuerpos scFv, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una molécula de ARNm de Fv monocatenaria (scFv) reticulada con una puromicina, o con un análogo de la misma, comprendiendo dicha molécula un ARNm que codifica un scFv 5' y una secuencia espaciadora 3', cuya molécula está reticulada con un conector de ácido nucleico monocatenario, comprendiendo el conector una puromicina, o un análogo de la misma, en un extremo 3' y un Psoraleno C6 en el extremo 5';
- 10 (b) traducir *in vitro* la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina en presencia de un marcador en condiciones levemente oxidantes para formar una molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada;
- (c) purificar la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada;
- 15 (d) someter la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada purificada a una selección por antígenos con al menos un antígeno; y
- (e) recuperar las moléculas de ARNm de scFv reticuladas con puromicina/proteína marcadas purificadas usando perlas magnéticas basadas en afinidad.
2. El método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende la etapa de (f) realizar la transcripción inversa del ARNm de scFv después de la selección por antígenos para producir un ADNc.
3. El método de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende la etapa de (g) amplificar el ADNc.
4. El método de la reivindicación 1, donde el marcador es un marcador radioactivo, donde preferentemente el marcador radioactivo es <sup>35</sup>S metionina o cisteína.
5. El método de la reivindicación 1, donde la secuencia espaciadora 3' comprende de aproximadamente 0 a aproximadamente 200 aminoácidos, o donde la secuencia espaciadora 3' comprende aproximadamente 16 aminoácidos, o donde la secuencia espaciadora 3' comprende una etiqueta de afinidad.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, donde el conector de ácido nucleico comprende, de 5' a 3':
- Psoraleno C6;
  - ribonucleótidos 2'OMe que comprenden la secuencia UAGCGGAUGC (SEC ID N°: 20);
  - 35 - seis grupos de trietilenglicol o PEG-150;
  - dos restos de desoxicitidina; y
  - Puromicina.
7. El método de la reivindicación 1, donde la molécula de ARNm de scFv está fotorreticulada con el conector de ácido nucleico por UVA.
8. El método de la reivindicación 1, donde la molécula de ARNm de scFv comprende un promotor 5' seleccionado del grupo que consiste en T7, SP6 y T3, o donde la molécula de ARNm de scFv comprende una región 5' no traducida del virus del mosaico del tabaco.
- 45 9. El método de la reivindicación 1, donde la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina/proteína marcada se purifica por cromatografía con oligodT, o usando perlas de agarosa con anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2, o por cromatografía con oligodT y perlas de agarosa con anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2.
- 50 10. El método de la reivindicación 1, donde el antígeno es un péptido, una proteína, un hapteno marcado con biotina, una proteína de fusión con un fragmento cristalizante (Fc) de inmunoglobulina humana, una proteína de fusión con un fragmento cristalizante (Fc) de inmunoglobulina murina, o una población de células.
11. El método de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL-12, un anticuerpo anti-HA, un anticuerpo murino, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde
- adicionalmente se realiza una traducción *in vitro* de la molécula de ARNm de scFv reticulada con puromicina en presencia de GSSG/GSH, preferentemente donde adicionalmente se realiza una traducción *in vitro* de la molécula de ARNm de scFv reticulada con una puromicina en presencia de la proteína disulfuro isomerasa (PDI); más preferentemente donde adicionalmente se realiza una traducción *in vitro* de la molécula de ARNm de scFv reticulada con una puromicina en ausencia de ditiotreitól;
  - 60 o
  - 65 - adicionalmente se realiza una traducción *in vitro* de la molécula de ARNm de scFv reticulada con una puromicina en ausencia de ditiotreitól.

13. El método de la reivindicación 1, donde el método no comprende una etapa de protección de ARNm, o donde el método no comprende una etapa de transcripción inversa *in vitro* antes de la etapa de purificación.
- 5 14. El método de la reivindicación 1, donde antes, durante o después de cualquiera de las etapas (a) a (g) se añade un inhibidor de RNasa.
15. El método de la reivindicación 1, donde dicha etapa de purificación comprende la transcripción inversa del ARNm en ausencia de ditiotreitol para producir un ADNc.
- 10 16. El método de la reivindicación 2 o 15, donde el ADNc se eluye por hidrólisis alcalina a un pH de aproximadamente =8,0 a aproximadamente un pH=10,0, o donde el que el ADNc se eluye por calor, o donde el ADNc se eluye por un ácido a un pH de aproximadamente =3,0 a aproximadamente pH=6,0.
- 15 17. El método de la reivindicación 15, donde el ADNc se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa.
18. El método de la reivindicación 17, donde la reacción en cadena de la polimerasa emplea una ADN polimerasa termoestable, o donde la reacción en cadena de la polimerasa emplea una enzima de amplificación seleccionada del grupo que consiste en Platino HiFi y KOD.
- 20 19. El método de la reivindicación 1, donde las perlas se seleccionan del grupo que consiste en estreptavidina-M280, neutravidina-M280, SA-M270, NA-M270, SA-MyOne, NA-MyOne, SA-agarosa y NA-agarosa.

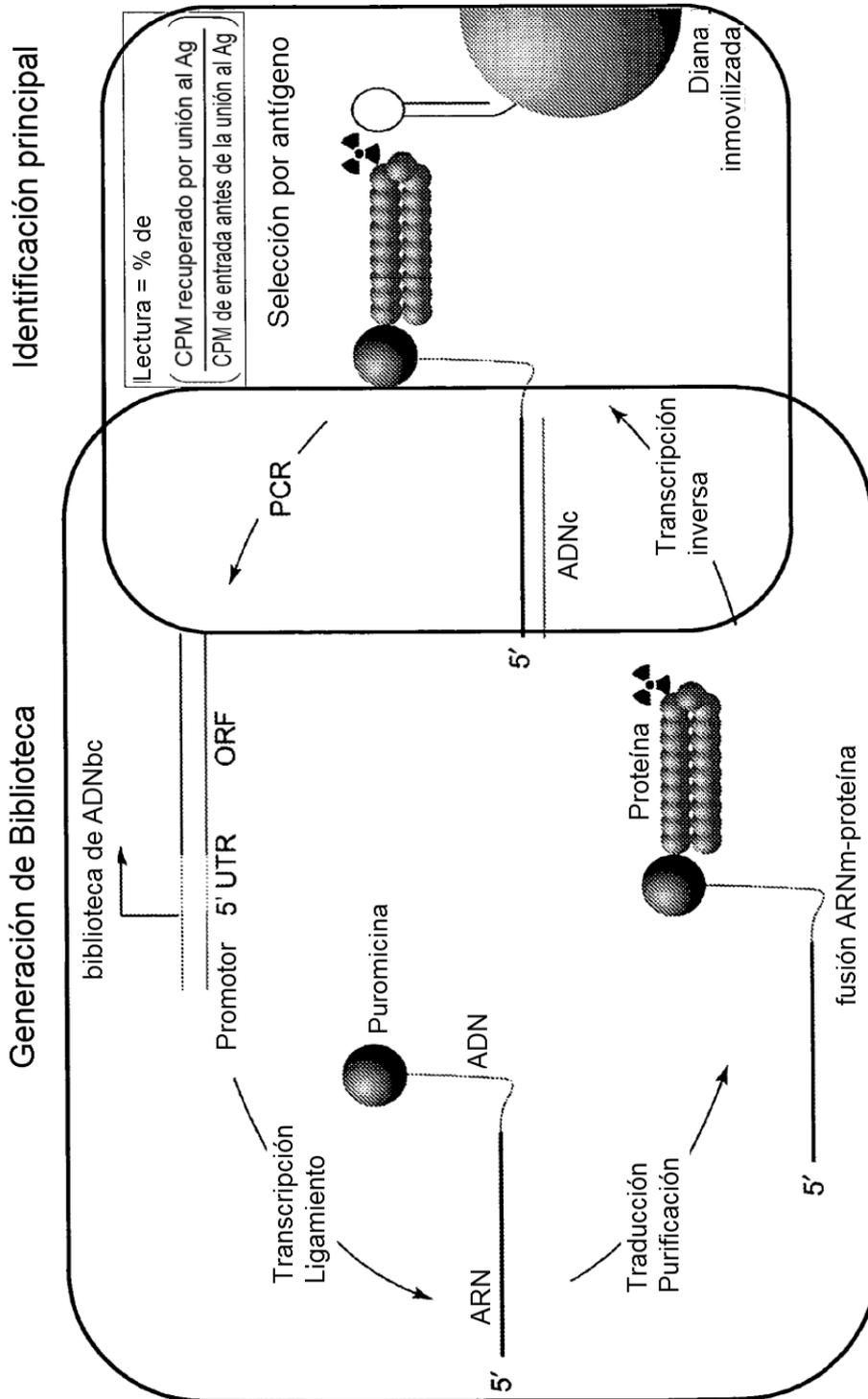


Fig. 1

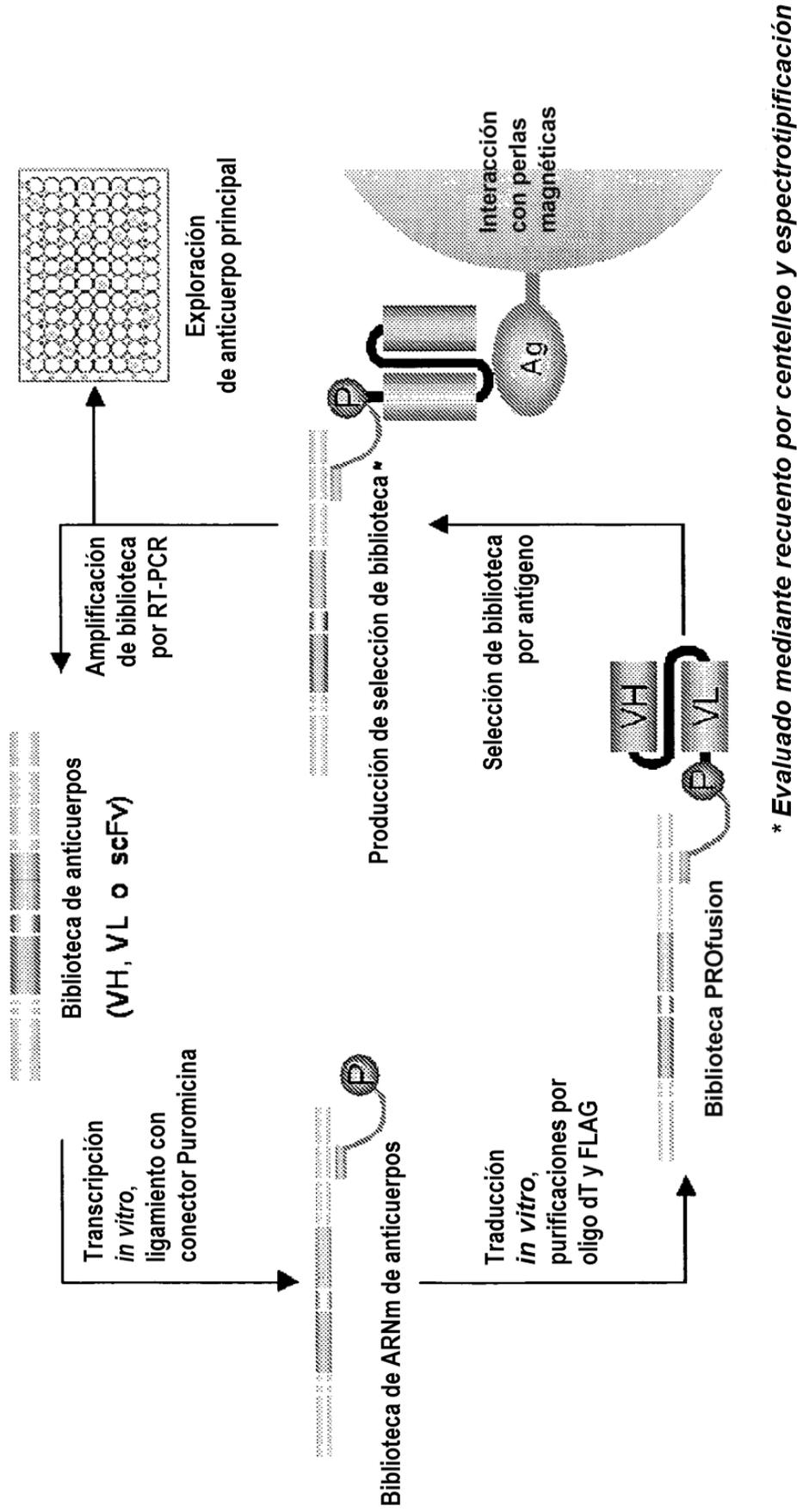


Fig. 2



*Fig. 3*

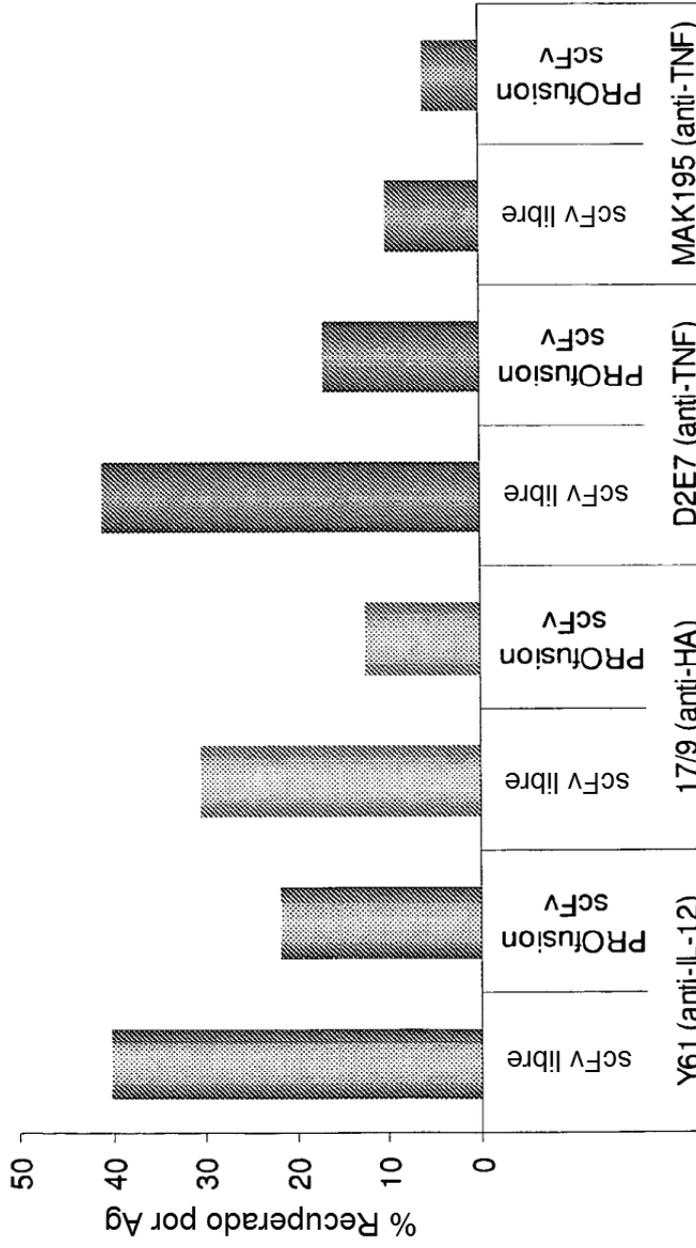
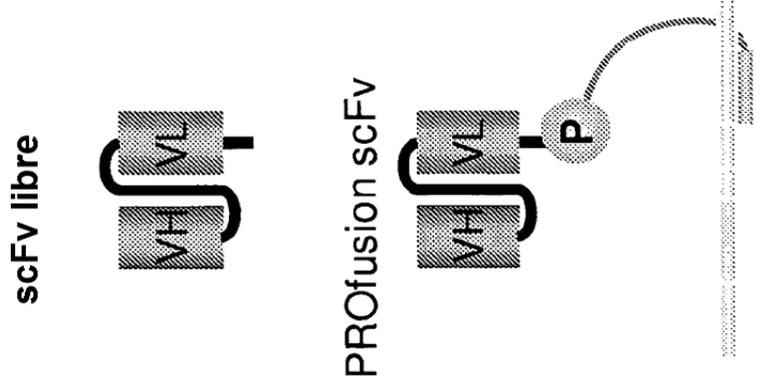
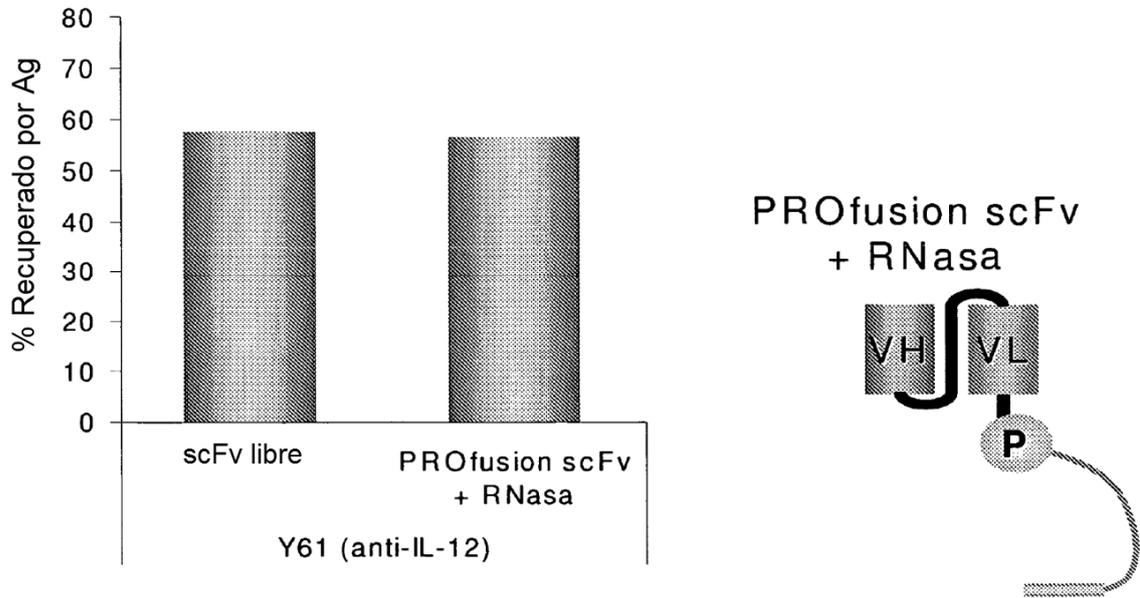


Fig. 4b

Fig. 4a



*Fig. 5*

**D2E7 (anti-TNF)**

Corto T7 TMV-UTR D2 VH GS E7 VL Ck FLAG Conector sitio Poli A

21 aa

Medio

Ck

56 aa

Largo

Ck

113 aa

*Fig. 6*

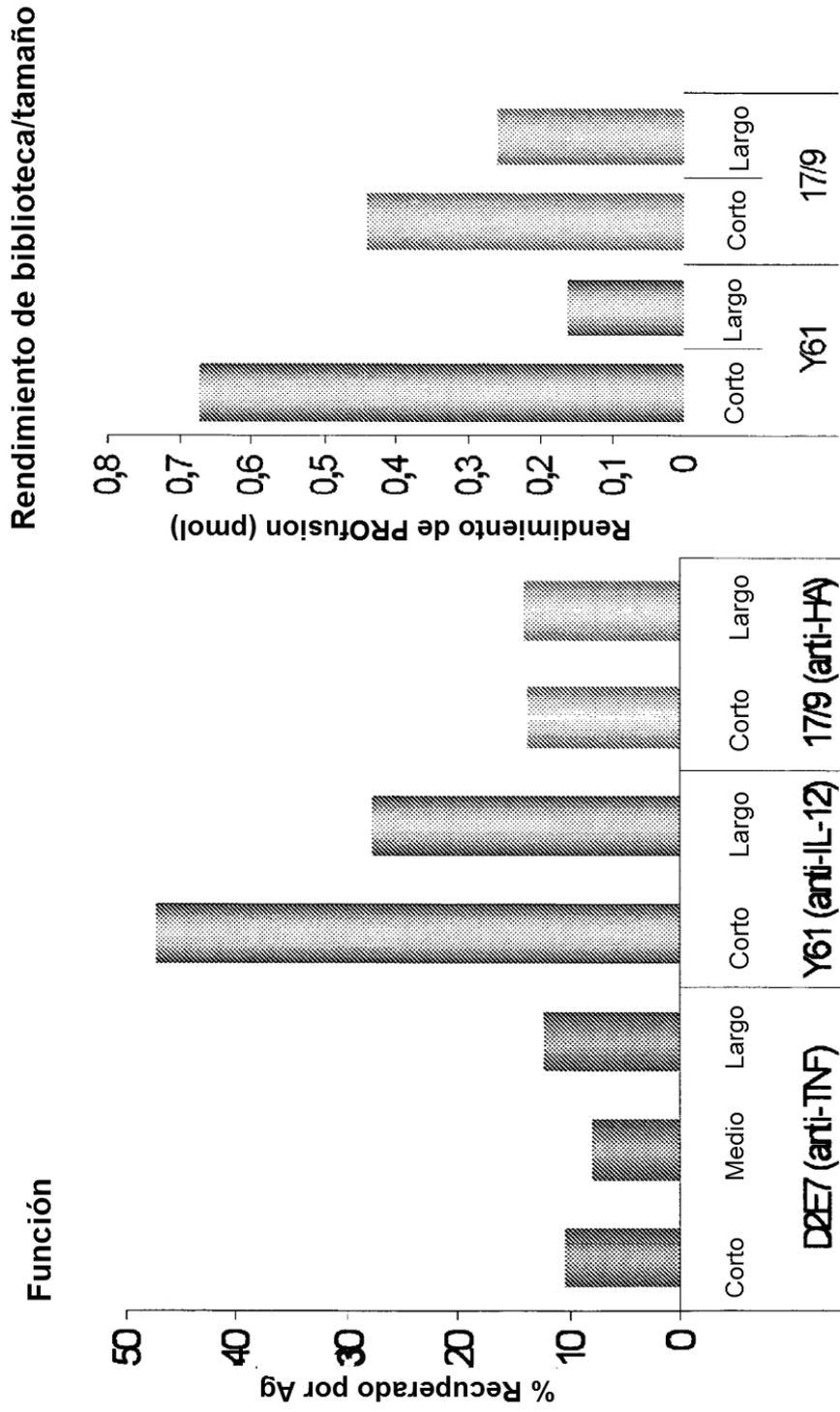


Fig. 7

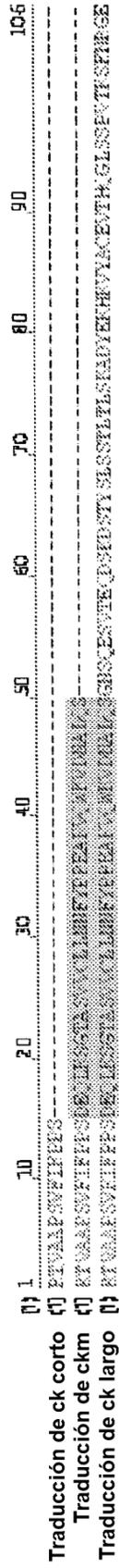
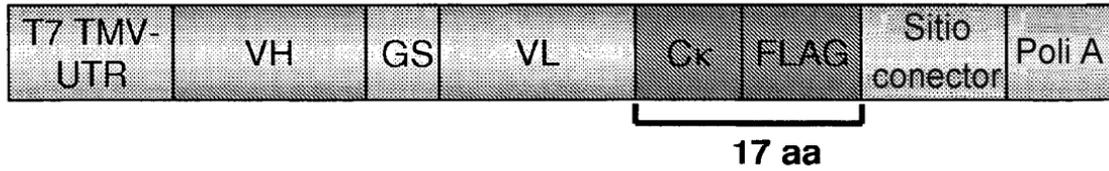
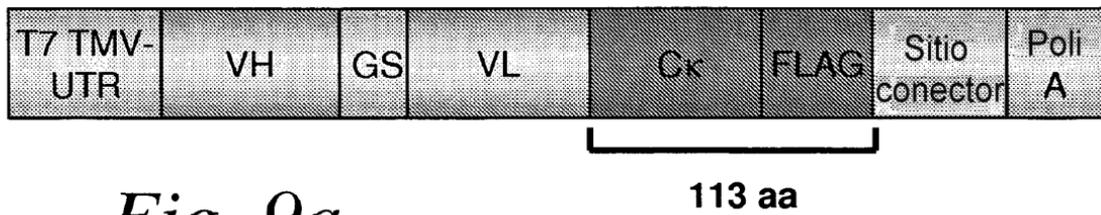


Fig. 8

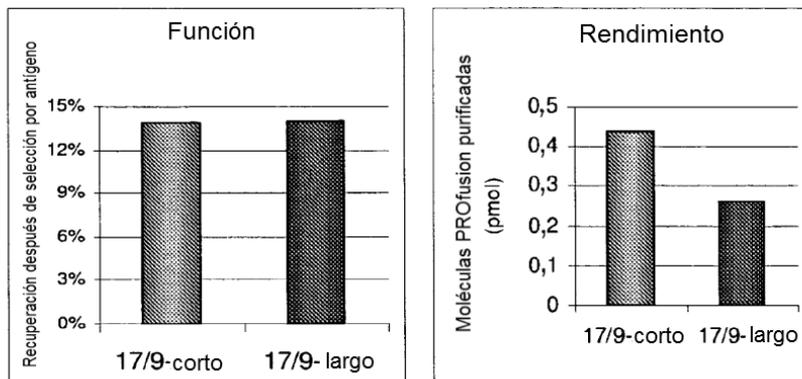
17/9-corto



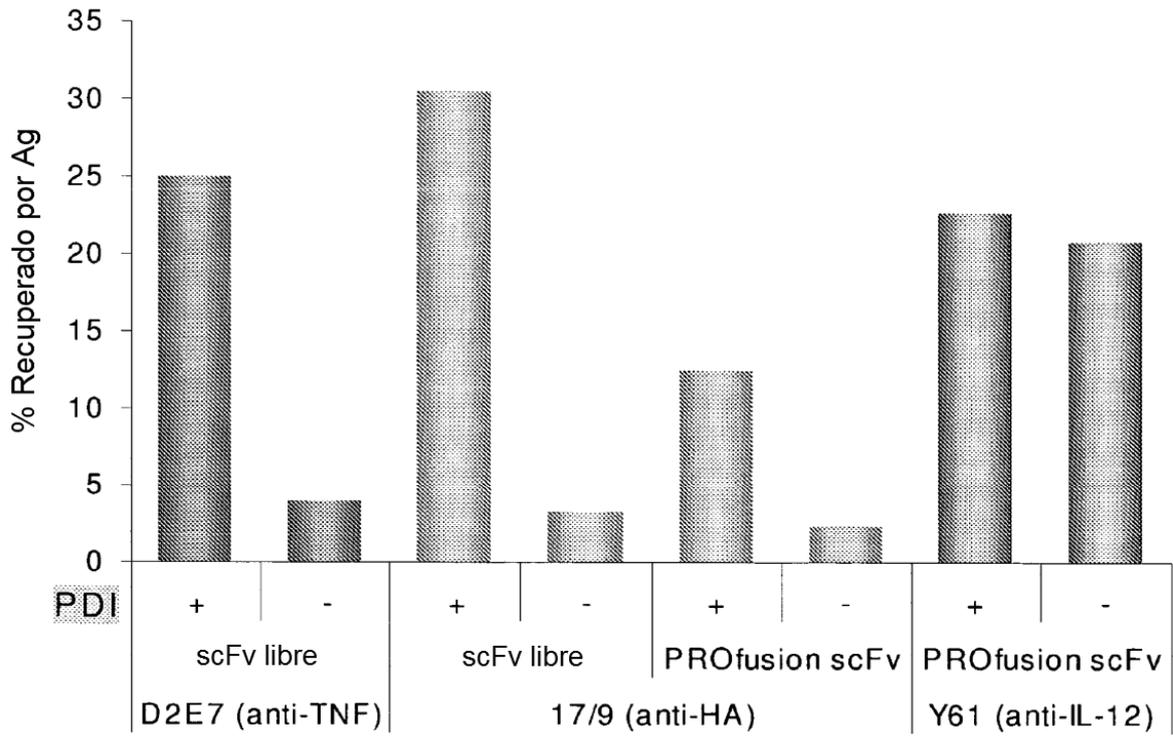
17/9-largo



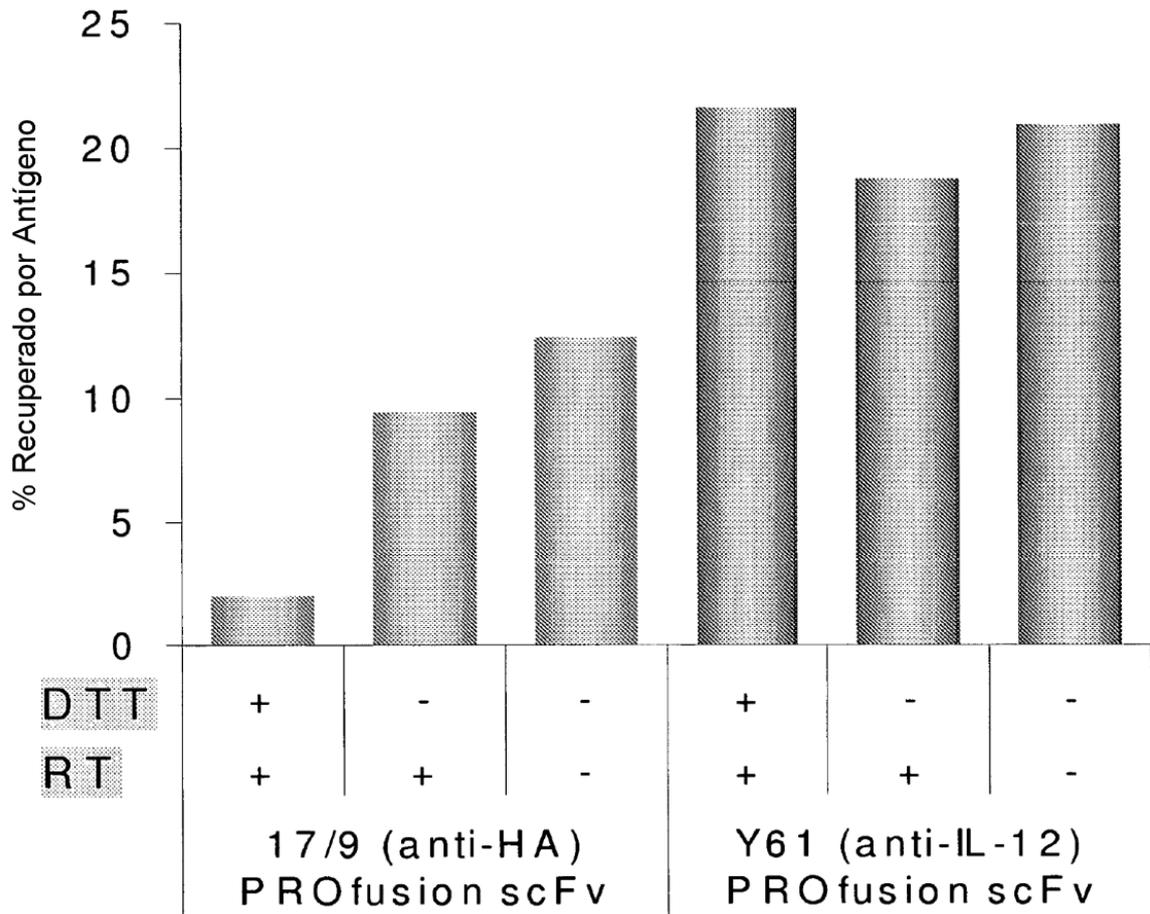
*Fig. 9a*



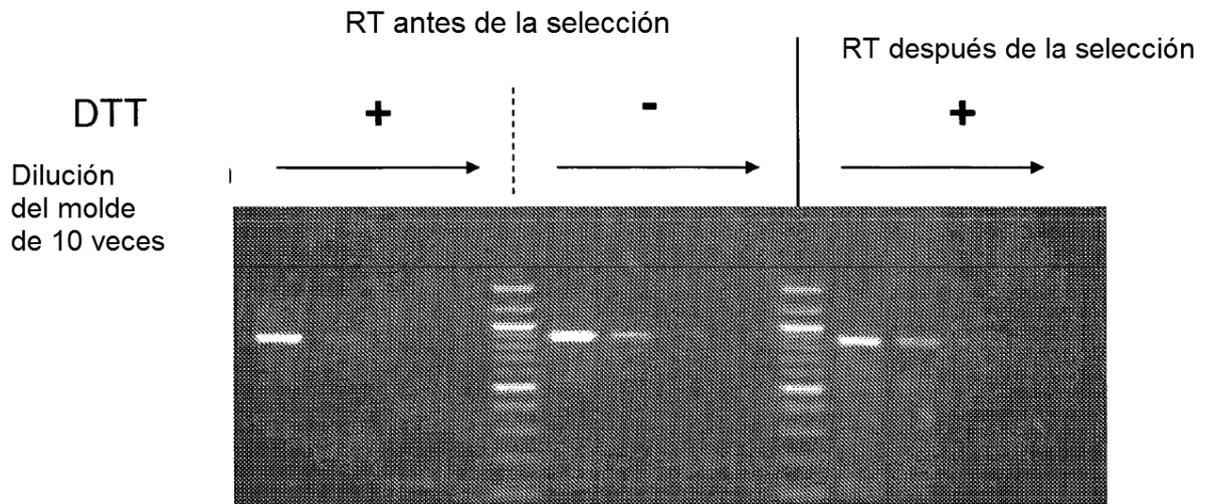
*Fig. 9b*



*Fig. 10*

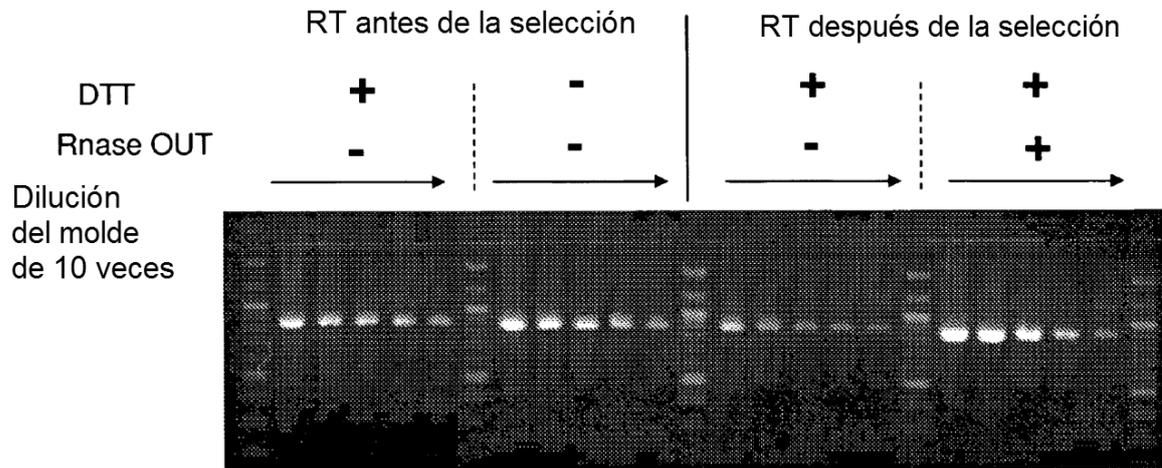


*Fig. 11*



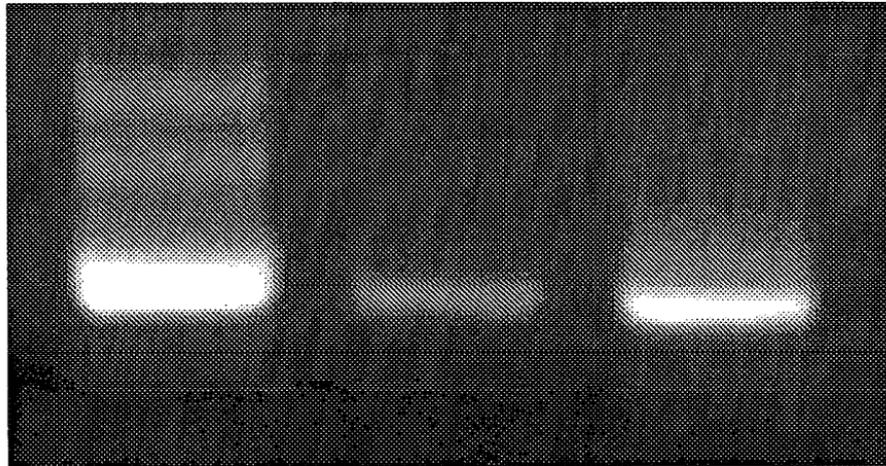
\* El molde se normalizó por volumen de perlas, no por recuentos

*Fig. 12*

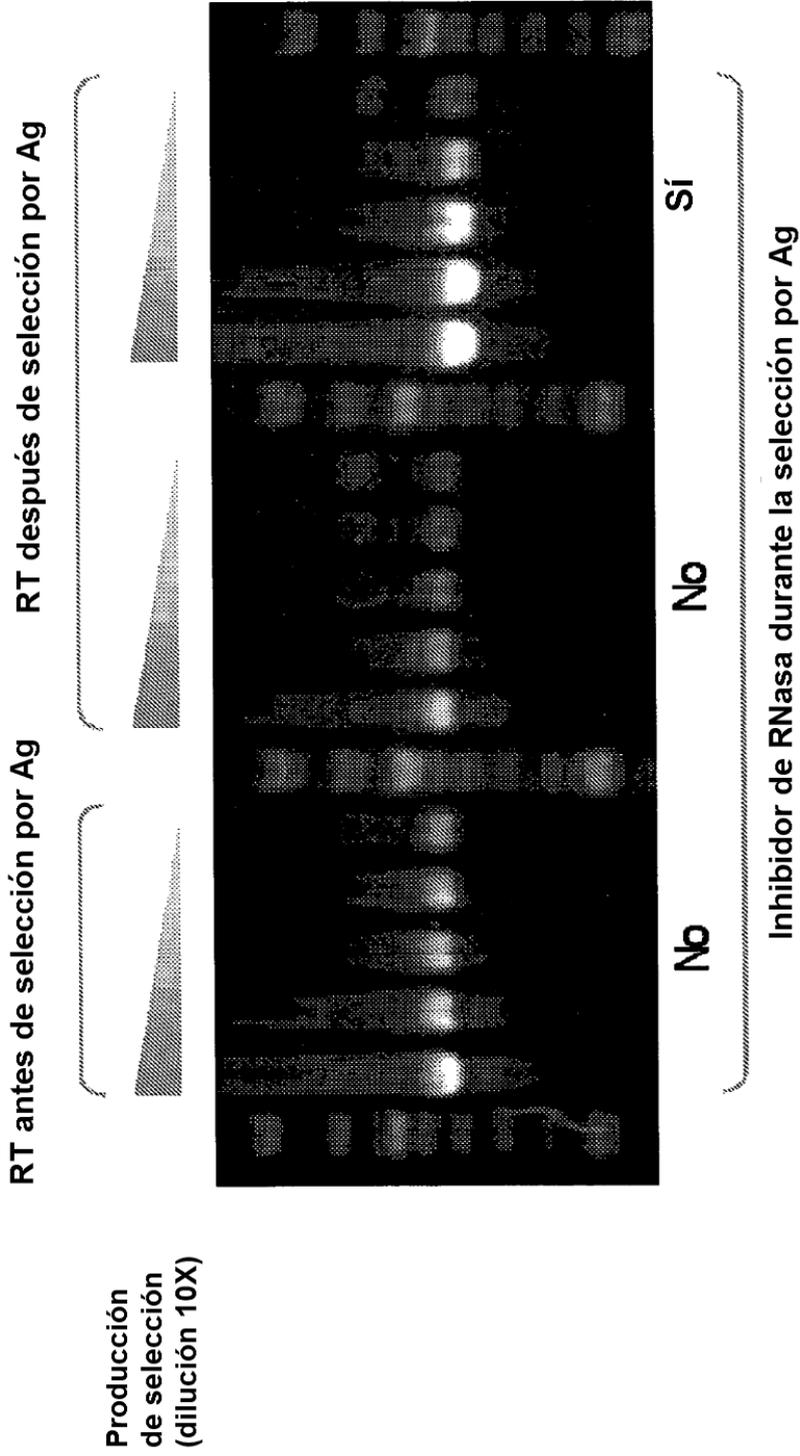


*Fig. 13*

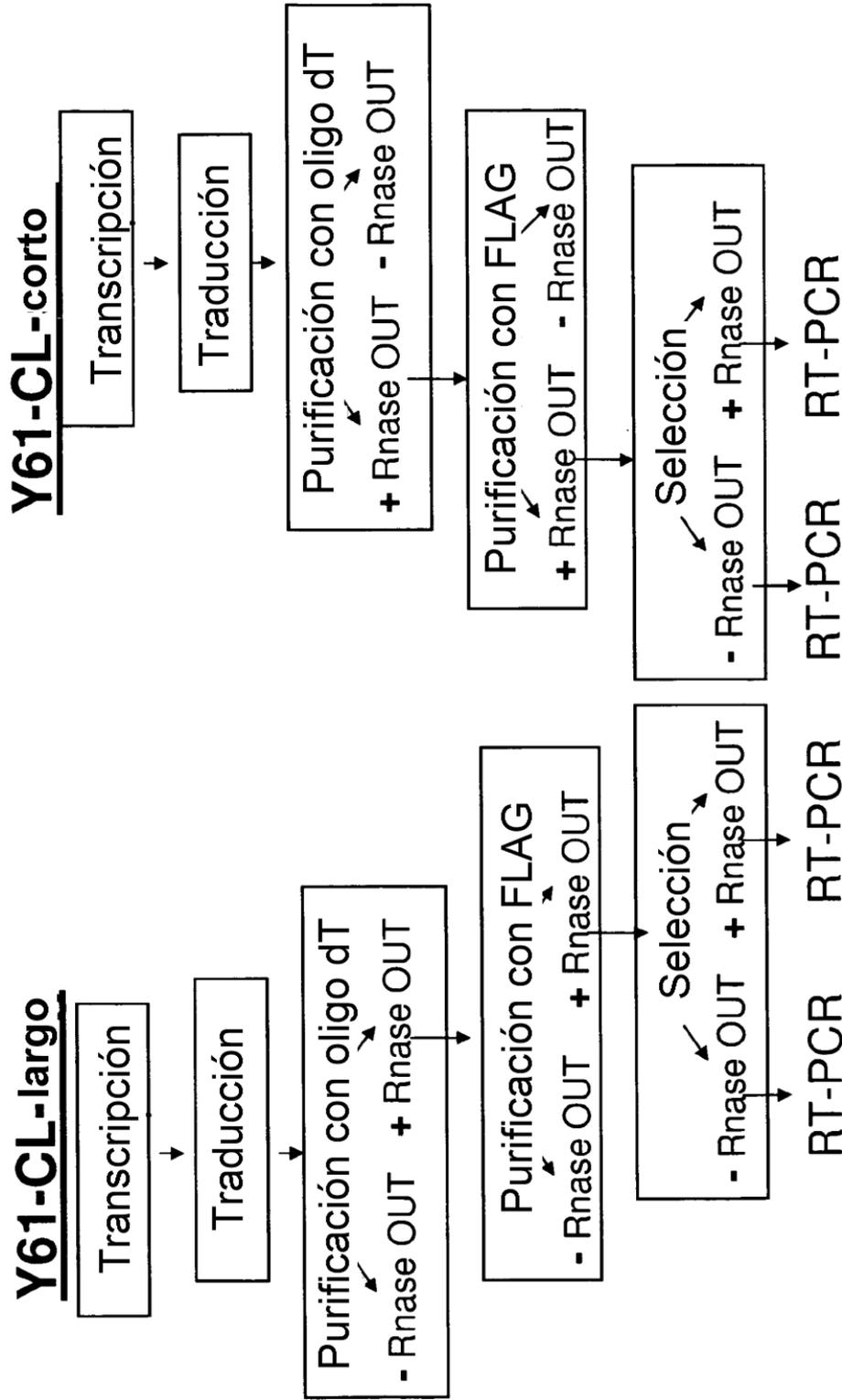
RT	<u>Pre-</u>	<u>Post-selección</u>	
Elución	Alcalina	Ácida	Ninguna



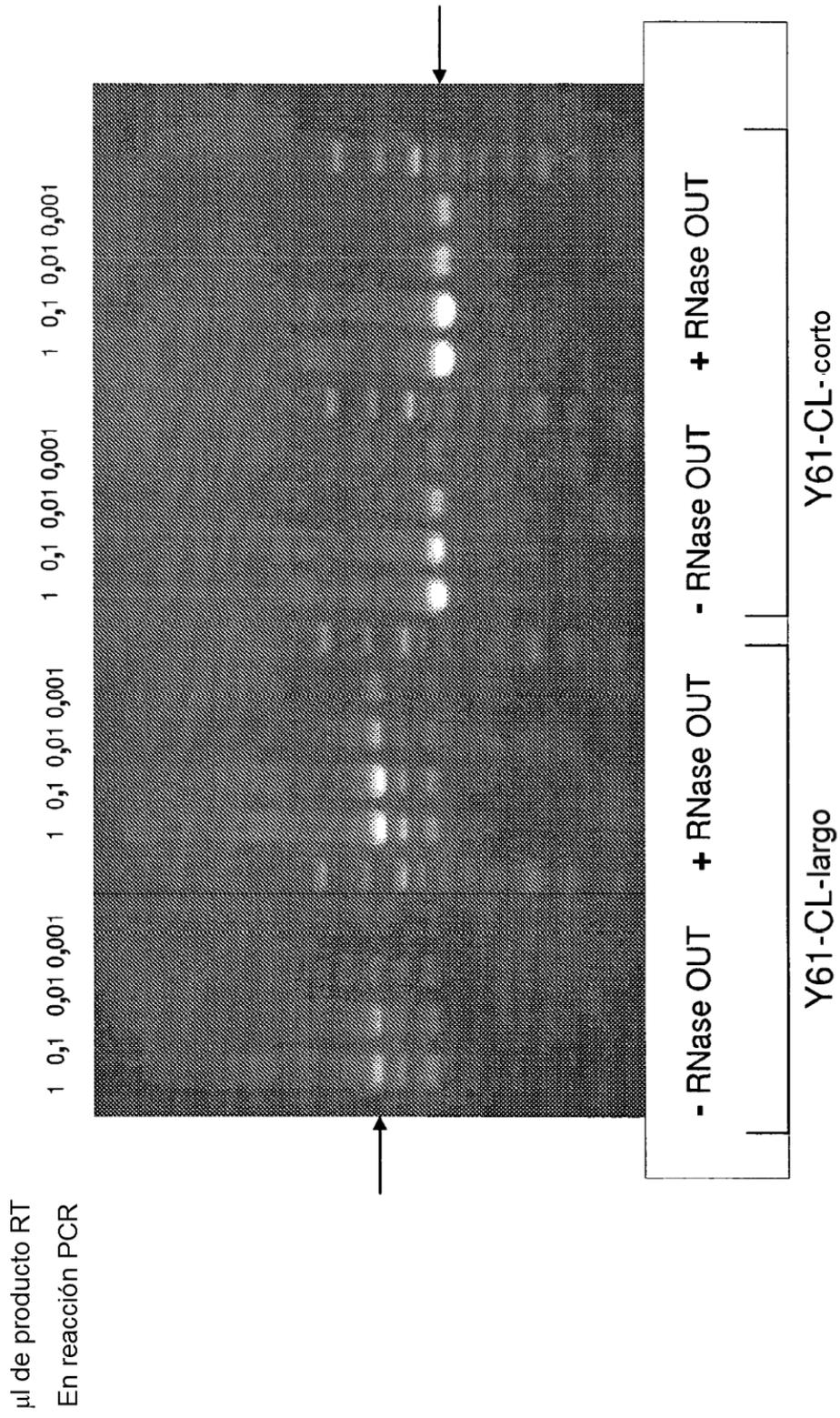
*Fig. 14*



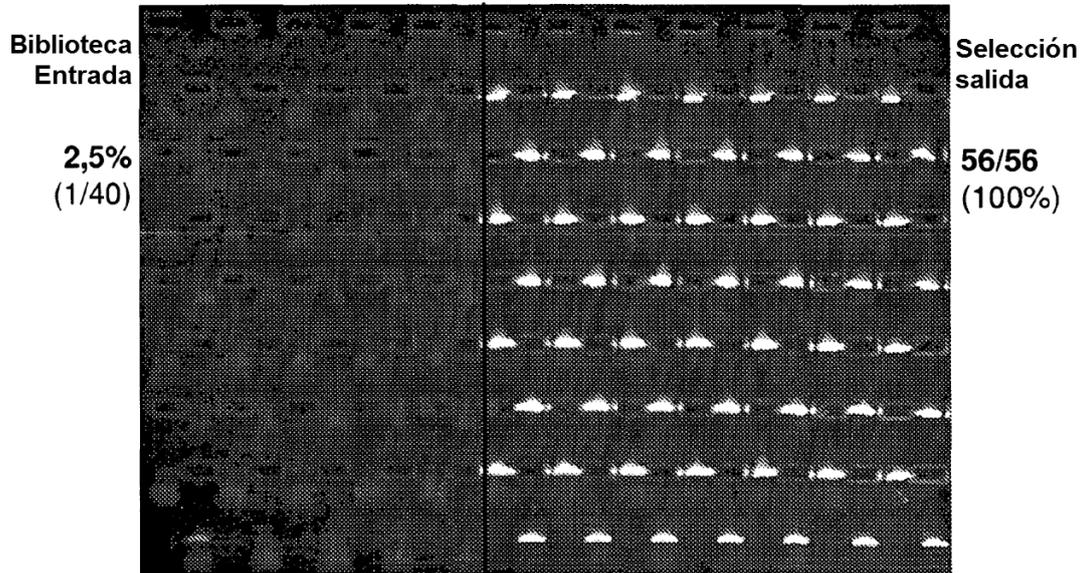
*Fig. 15*



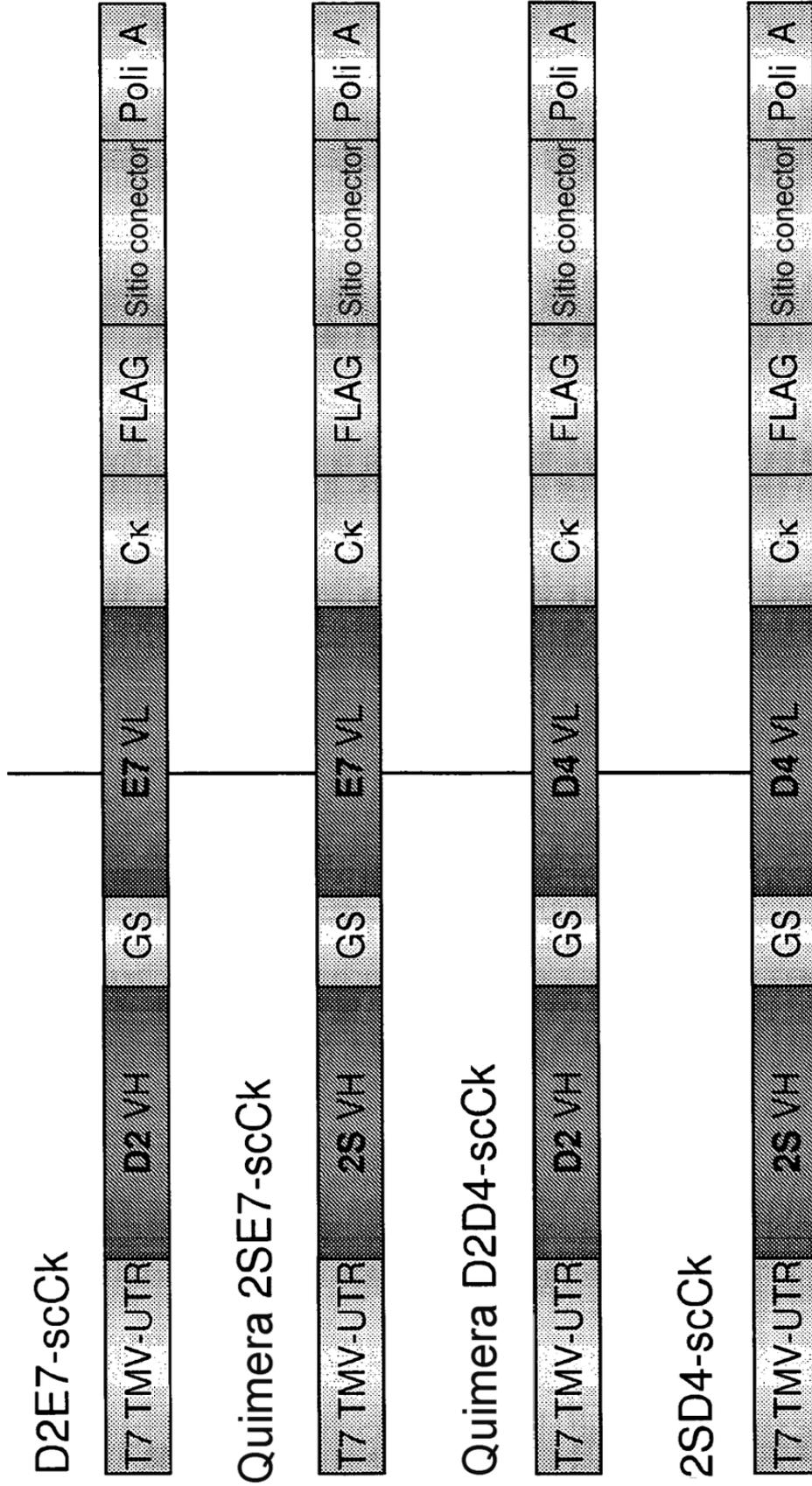
*Fig. 16*



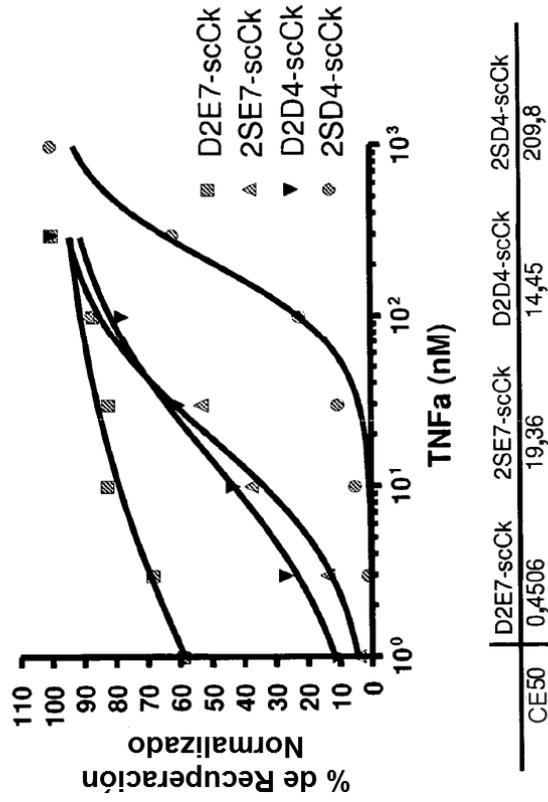
*Fig. 17*



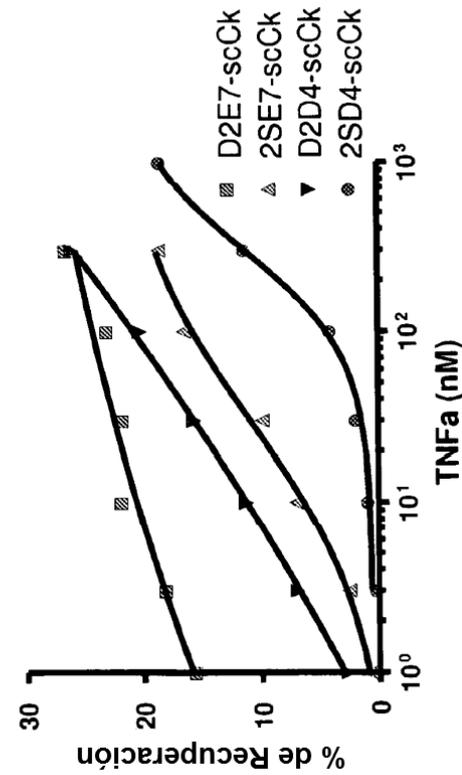
*Fig. 18*



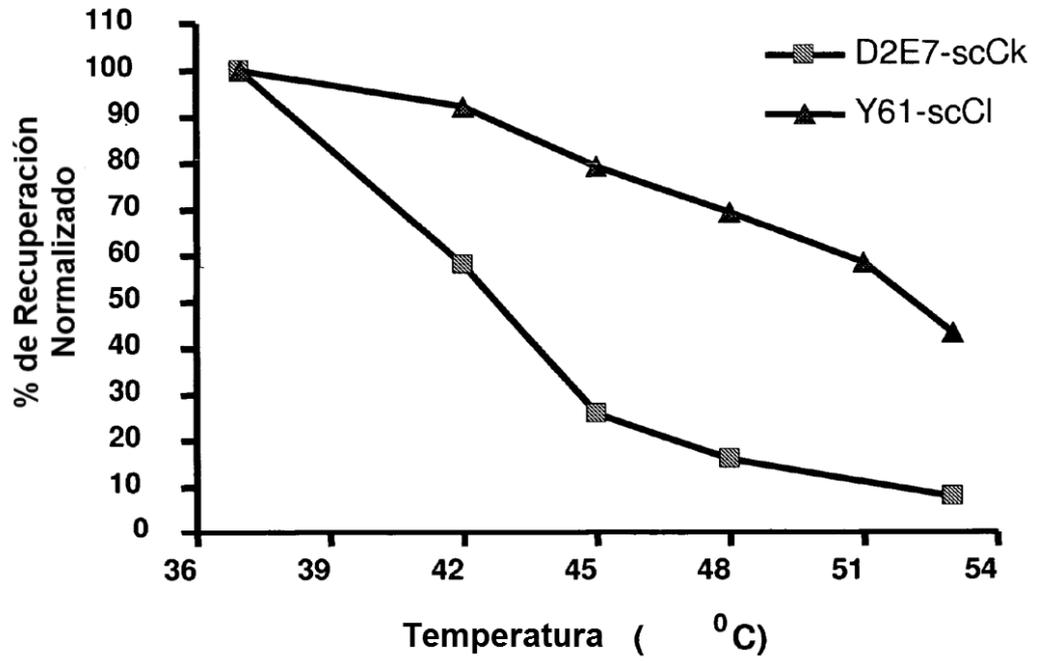
*Fig. 19*



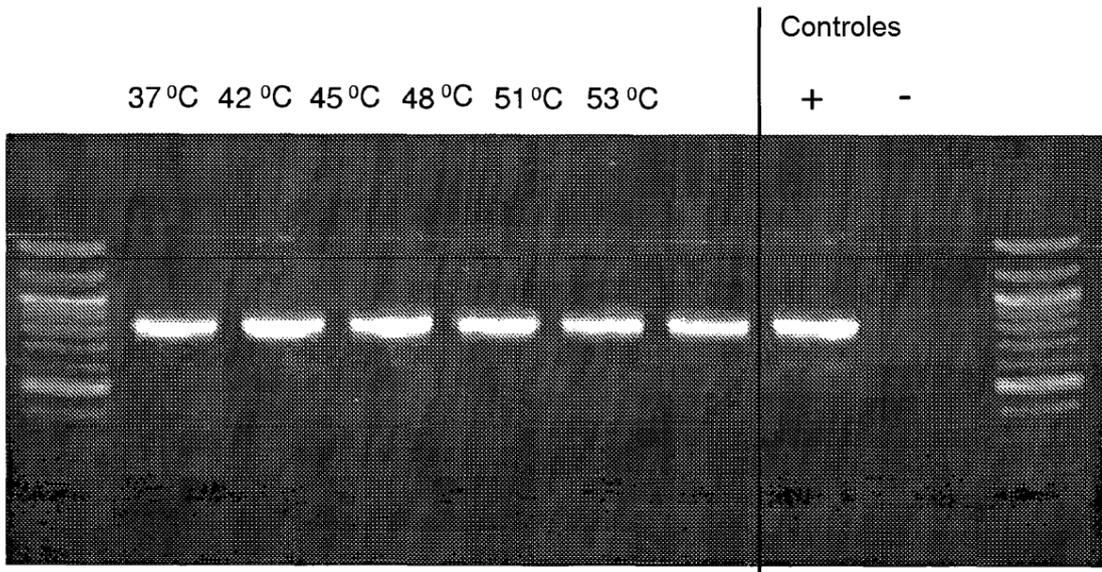
*Fig. 20a*



*Fig. 20b*

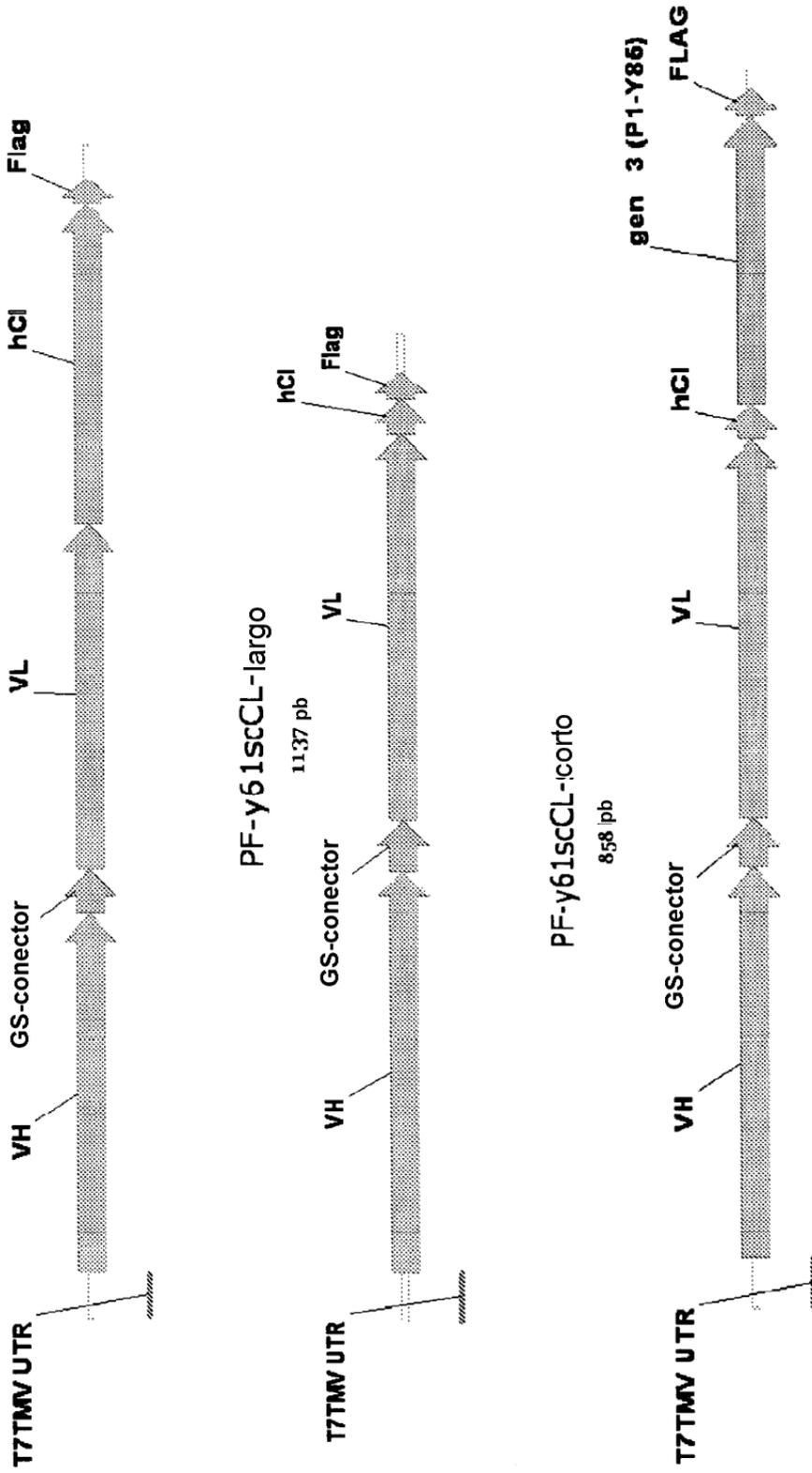


*Fig. 21*

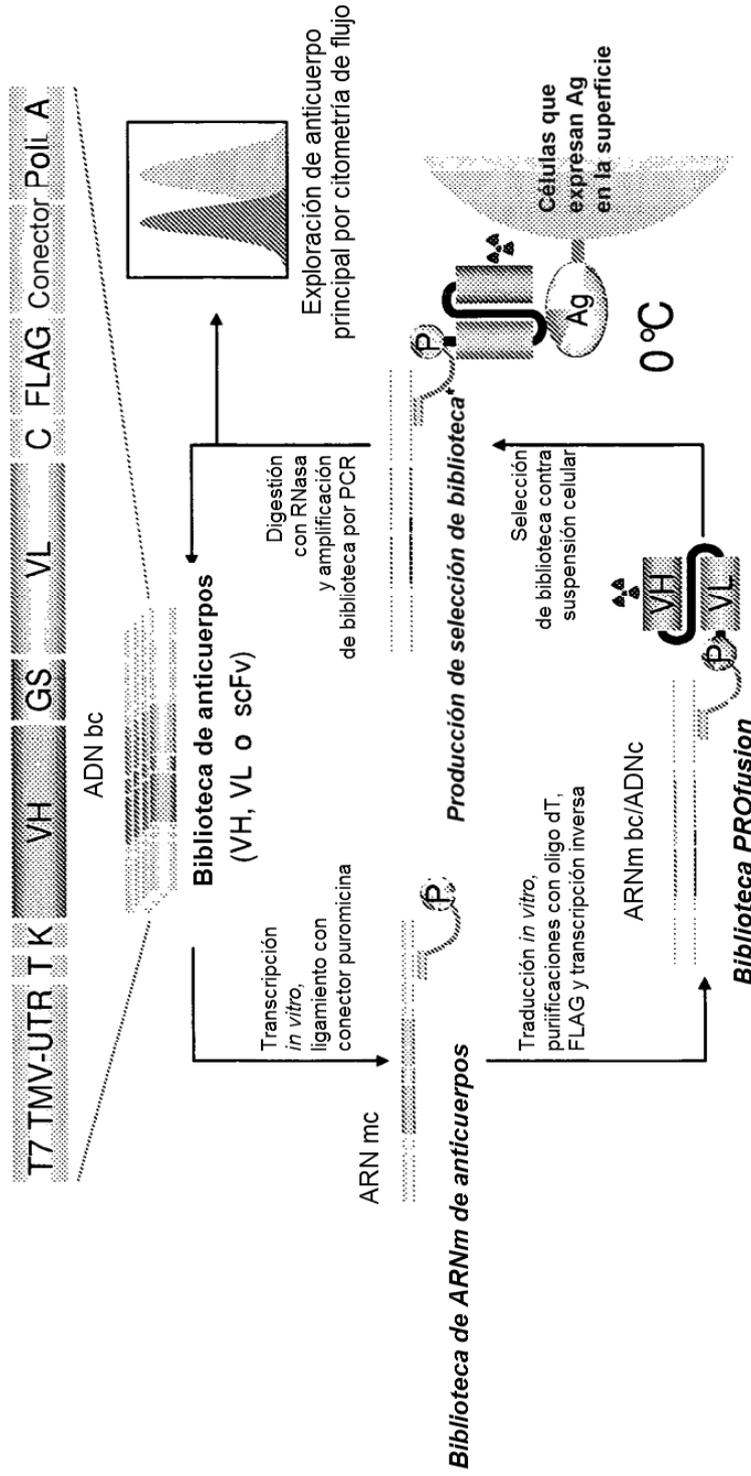


*Fig. 22*

Construcciones Generadas Y61 Monocatenarias a Ensayar en Formato PROfusión:



*Fig. 23*



\* Evaluado mediante recuento por centelleo y espectrotipificación

Fig. 24