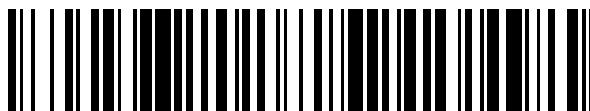


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 083**

51 Int. Cl.:

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2013** **E 13188639 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2725359**

54 Título: **Método de separación de células por medio del uso de un sistema de liberación para conjugados célula-anticuerpo-sustrato que contiene una unidad espaciadora de polietilenglicol**

30 Prioridad:

23.10.2012 EP 12189516

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

08.07.2015

73 Titular/es:

MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE

72 Inventor/es:

DOSE, CHRISTIAN, DR. y
BRIEDEN, JENNIFER

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 540 083 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 de separación de células por medio del uso de un sistema de liberación para conjugados célula-anticuerpo-sustrato que contiene una unidad espaciadora de polietilenglicol.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de separación de células por medio del uso de un sistema de liberación para conjugados célula-anticuerpo-sustrato que incluye un método para disociar selectivamente los conjugados.

Antecedentes de la invención

La habilidad de la biotina para unirse a la estreptavidina, la avidina, y otras moléculas de unión a biotina se ha explotado por varias décadas, debido a la alta afinidad, especificidad y amplia aplicabilidad de este sistema.

Para mejorar las propiedades de liberación de los sistemas de afinidad biotina/estreptavidina, se introducen derivados de biotina y estreptavidina modificados químicamente, en donde solamente uno o inclusive ambas parejas de unión se modificaron. Tales modificaciones disminuyen la estabilidad del complejo biotina/estreptavidina en varios órdenes de magnitud y de ese modo facilitan la disociación de las dos parejas de unión (ver por ejemplo US 20080255004). Además, se desarrollaron proteínas de estreptavidina mutadas con reducida afinidad por la biotina o sus análogos (M. Qureshi y otros, J. Biol. Chem. 276 (2001) 46422-46428; T. Sano y otros, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 3180-3184). US 5506121 describe las llamadas "etiquetas-estrept" es decir péptidos con afinidad de unión disminuida por la estreptavidina.

La modificación de la biotina o la estreptavidina es laboriosa. A partir de que muchos reactivos para el acoplamiento de la biotina con sustratos, como los anticuerpos, están disponibles comercialmente, es ampliamente extendido usar la biotina no modificada como agente de marcaje.

En este sentido, US 5215927 describe el aislamiento de células objetivo al poner en contacto la población de células deseada con un anticuerpo monoclonal y la subsecuente incubación con una inmunoglobulina anti-especies biotinilada dirigida al anticuerpo monoclonal específico. La mezcla se separa sobre una fase sólida que comprende avidina inmovilizada como molécula de unión a biotina, lo que facilita la inmovilización de las células objetivo y la separación de los objetivos no marcados. Las células deseadas subsecuentemente se liberan por agitación mecánica para romper el complejo inmovilizado.

El uso de mecanismos de liberación mediados por la degradación por enzimas no selectiva, reacciones químicas, fuerzas mecánicas intensas, alta temperatura, o condiciones salinas fuertes no son deseables para la separación de células vivas, porque es importante preservar la integridad y viabilidad de las células. En consecuencia, se desean mecanismos que permitan la rápida y selectiva liberación de las células objetivo en condiciones fisiológicas.

Alternativamente al clivaje enzimático o químico o al uso de moléculas biotina/estreptavidina modificadas, los sistemas biotina/estreptavidina además se pueden clivar por un mecanismo de competencia con el ligando. Por ejemplo, una molécula biotinilada se puede liberar de un soporte de estreptavidina por la adición de un exceso de biotina libre, de ese modo reemplaza a la molécula biotinilada.

Los métodos basado en la competencia de la biotina o la estreptavidina libres contra las contrapartes respectivas (estreptavidina o biotina) se conocen en numerosas variantes. James Hirsch y otros dan una visión general de estas técnicas en Analytical Biochemistry 308 (2002) 343-357.

Además, Ke Shan y otros describen en "Avidin-Biotin-PEG-CPA Complexes as Potential EPR-Directed Therapeutic Protein Carriers: Preparation and Characterization", Bioconjugate Chemistry, vol. 18, núm. 5, 1 de septiembre 2007 (2007-09-01), páginas 1644-1650e "Intermolecular interaction of avidina and PEGylated biotin", Bioconjugate Chemistry, vol. 18, núm. 6, 21 de noviembre 2007 (2007-11-21), páginas 2109-2114, el uso de la biotina para la disociación de los complejos Avidina-Biotina-PEG-Enzima. Un método similar se describe por Rampersaud y otros: "Novel discrete PEG-based crosslinking reagents for conjugation of antibodies and proteins to biotin, fluorochromes, enzymes and gold that eliminate aggregation, improves solubility, reduces non-specific binding and enhances low level detection limits" in MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 22, 2011, página 1931.

La reacción de competencia de la biotina/estreptavidina libre contra las respectivas contrapartes unidas se describe en el documento WO 92/16841 para medios analíticos. El documento WO 92/16841 describe entre otros un método para detectar una molécula reportera, que se une específicamente a un analito y una fase insoluble mediante un sistema de unión estreptavidina/biotina. Después del procedimiento de trabajo, el sistema de unión estreptavidina/biotina se cliva por un ligando de desplazamiento y el analito liberado se detecta analíticamente mediante una molécula reportera.

US 2008/0255004, US 6869606, y US 4656252 describen anticuerpos biotinilados que comprenden biotina modificada, en donde la porción biotina y la porción anticuerpo de los anticuerpos biotinilados se separan por un grupo espaciador que consiste en un arilo, alquilo, o grupo ácido aminocaprílico. El uso de los grupos hidrofóbicos arilo o alquilo se espera que cause aglomeración en soluciones acuosas. A partir de que las condiciones fisiológicas de los sistemas biológicos usualmente requieren soluciones acuosas, la aglomeración es un problema eminente para las técnicas que usan sustancias bastante hidrofóbicas. Las moléculas espaciadoras derivadas a partir del ácido amino caprónico (llamadas "enlazador LC") poseen una cadena de alquilo lineal con residuos que soportan químicas de bioconjugación homo- o heterofuncionales.

US 5518882 describe un método similar, en donde las células objetivo se unen a un soporte sólido, por ejemplo partículas magnéticas. Esto permite un enriquecimiento adicional por la aplicación de un campo magnético, que inmoviliza las células objetivo acopladas a las perlas magnéticas. Las células objetivo se puede liberar de las partículas por el clivaje del sistema de unión a biotina con un ligando de desplazamiento. Preferentemente, el conjugado "(perla magnética)-antibiotina-biotina-anticuerpo-célula" se cliva por la adición de estreptavidina libre en acceso, lo que resulta en un conjugado "(perla magnética)-antibiotina" y uno "estreptavidina-biotina-anticuerpo-célula".

Generalmente, una reacción de competencia, es decir el desplazamiento de un primer ligando con un segundo ligando solo procederá hasta que se alcance el equilibrio entre las cinéticas de la reacción de unión del primer y el segundo ligando. El equilibrio depende de las respectivas fuerzas de unión y concentraciones del ligando y las condiciones termodinámicas de la reacción. Las reacciones de competencia conocidas desplazan la biotina por estreptavidina por lo tanto llevan ya sea a una liberación incompleta o son difíciles de controlar ya que las cinéticas subyacentes usualmente no se conocen.

Los actuales sistemas de liberación no son suficientemente rápidos o fiables para un proceso que involucra el marcaje de células vivas, la separación o detección de células y el desmarcaje de las células objetivo.

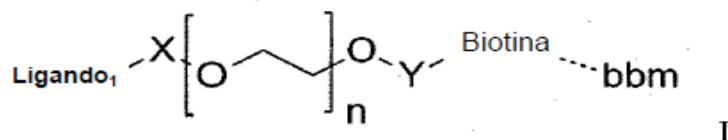
Breve descripción de la invención

Fue por lo tanto un objetivo de la presente invención proporcionar un sistema de liberación fiable y altamente eficiente que comprende un anticuerpo biotinilado para la detección de células vivas para usar en un método de separación de células.

Sorprendentemente, se encontró que la afinidad de unión de una pareja de unión marcada dirigida a la porción biotina de un anticuerpo biotinilado se puede ajustar por la colocación de una molécula espaciadora biocompatible entre la porción biotina y el anticuerpo, en donde la pareja de unión marcada está provista con un medio de detección. Con tal conjugado, las células pueden marcarse primero para la identificación o el aislamiento y después de la identificación o el aislamiento, la marca se puede retirar para desmarcar las células objetivo deseadas.

El objetivo de la invención es por lo tanto un método para la separación de células objetivo a partir de una muestra de células que comprende las etapas:

a) incubar la muestra de células con un conjugado desprendible que comprende un ligando biotinilado que tiene una porción biotina, una porción ligando (Ligando₁) y una molécula de unión a biotina (bbm) unida a la porción biotina del ligando biotinilado, en donde la porción biotina y la porción ligando del ligando biotinilado están separadas por un grupo espaciador que consiste en polietilenglicol de acuerdo con la fórmula general I



con $n = 1 - 500$, y X, Y = el mismo o diferentes, grupos alquilo sustituidos que tienen 1 a 20 átomos de carbono con residuos amina, amida, y/o tioéter,

en donde el ligando es un primer anticuerpo para el que las células objetivo expresan un antígeno, y la molécula de unión a biotina (bbm) es un segundo anticuerpo que comprende una partícula magnética como soporte sólido,

b) separar las células marcadas con el soporte sólido obtenido en la etapa a) de la muestra de células por la aplicación de un campo magnético,

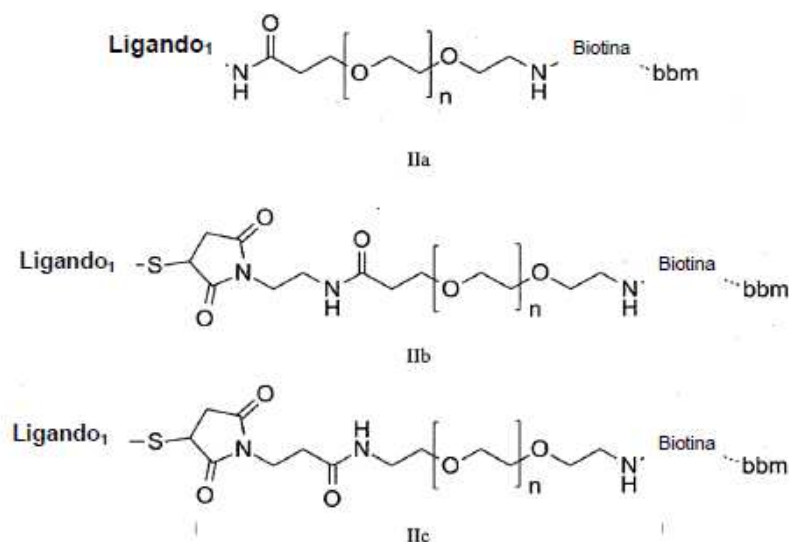
c) añadir un agente de liberación en una concentración suficiente para desplazar la molécula de unión a biotina (bbm) de la porción biotina del ligando biotinilado.

El conjugado de la fórmula I se disocia por tratamiento con un agente de liberación, que rompe la interacción entre la biotina y la molécula de unión a biotina.

El sistema de liberación usado en la invención se prepara por el acoplamiento de un ligando biotinilado que comprende un grupo espaciador que consiste en polietilenglicol entre la biotina y la porción ligando con una molécula de unión a biotina. El ligando biotinilado que comprende el grupo espaciador que consiste en unidades de polietilenglicol se puede acoplar con una o varias molécula de unión a biotina y *vice versa* lo que resulta en un conjugado desprendible que tiene uno o más sitios de clivaje desprendibles. En consecuencia, los conjugados desprendibles usados en la invención pueden comprender el ligando biotinilado, especialmente anticuerpos biotinilados que portan 1 a 20 moléculas de unión a biotina (bbm).

Preferentemente, el número n de unidades glicol en el espaciador de polietileno está entre 1 y 100, con mayor preferencia entre 1 y 25, y con la mayor preferencia entre 1 y 10.

En una primera, segunda y tercera modalidad de la invención, el conjugado desprendible tiene una estructura de acuerdo con la fórmula general IIa, IIb, o IIc. En estas modalidades, n significa el número de unidades de glicol como ya se describió.

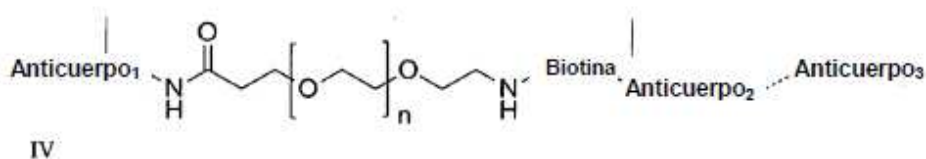


La Figura 1 muestra conjugados de acuerdo con la materia anterior que contienen biotina (1), LC-biotina (2), LC-LC-biotina (3) (no de acuerdo con la invención), y PEO-biotina (4) (de acuerdo con el método de la invención). LC significa "cadena larga", un residuo basado en ácido 6-aminocaproico; LC-LC significa un espaciador doble de ácido 6-aminocaproico, mientras PEO significa óxido de polietileno además conocido como polietilenglicol.

El término "biotina" se refiere al ácido 5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il]pentanoico. El término "biotina" incluye análogos o compuestos de biotina modificados, que soportan similares interacciones hospeder/huésped que la biotina no modificada como, por ejemplo, iminobiotina, destiobiotina, y DSB-X biotina. Preferentemente, la biotina no modificada se usa en la presente invención.

El término "ligando" se refiere a cualquier tipo de anticuerpo o anticuerpo fragmentado, dirigido contra antígenos expresados intracelular o extra celular. El término se refiere a anticuerpos completamente intactos o a derivados de anticuerpos fragmentados, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, sdAb, scFv, di-scFv que se sintetizan por procedimientos de recombinación que incluyen conjugados covalentes y no-covalentes que contienen estos tipos de moléculas. Preferentemente, el término "ligando" se refiere a un anticuerpo dirigido contra antígenos intracelulares expresados por las células objetivo, como IL2, FoxP3, CD154, o extra celulares, como CD3, CD14, CD4, CD8, CD25, CD34, CD56, y CD133.

- El término "molécula de unión a biotina" (bbm) se refiere a un anticuerpo, que se conjuga a un medio de detección y se desplaza de la porción biotina del ligando biotinilado por biotina o estreptavidina. Preferentemente, la molécula de unión a biotina (bbm) es un anticuerpo seleccionado de la clase de la inmunoglobulina, por ejemplo IgG, IgA, IgM, IgD, IgE derivadas de animales, como por ejemplo ratones, monos, cabras, conejos, ovejas, o yamas. Además, el término "molécula de unión a biotina" (bbm) se refiere a derivados de anticuerpos totalmente intactos o fragmentados, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, sdAb, scFv, di-scFv que se sintetizan por procedimientos de recombinación que incluyen conjugados covalentes y no-covalentes que contienen estos tipos de moléculas
- El término "agente de liberación" se refiere a cualquier compuesto capaz de unirse a la porción biotina del ligando biotinilado o la molécula de unión a biotina y de ese modo rompe la interacción entre la porción biotina y la molécula de unión a biotina. Los agentes de liberación adecuados son la estreptavidina o la biotina. El agente de liberación preferido en esta invención es la biotina. Las moléculas de estreptavidina adecuadas modificadas se describen por James Hirsch y otros en *Analytical Biochemistry* 308 (2002) 343-357. El consecuencia, el término "estreptavidina y derivados de esta" se refiere a cualquier molécula derivada de la estreptavidina que proporciona una afinidad de unión a biotina que es comparable con la afinidad de unión de la estreptavidina no modificada a la biotina así como a derivados y conjugados de la estreptavidina sin tener el propósito de disminuir especialmente la afinidad de unión a la biotina.
- El ligando, la molécula de unión a biotina (bbm) y/o el agente de liberación se puede proporcionar con un medio de detección, es decir, posee una marca que se puede usar para la detección. Los medios de detección pueden por ejemplo emitir una señal de detección, como una unidad cromófora, una unidad fluorescente, o una unidad radioactiva. Agentes de liberación marcados adecuados están, por ejemplo, disponibles comercialmente bajo los nombres comerciales "anti-biotina-PE" y "APC-Streptavidina" de Miltenyi Biotec GmbH, Alemania y BioLegend Inc., respectivamente.
- Además, el medio de detección puede ser un soporte sólido, sobre el que la molécula de unión a biotina (bbm) y/o el ligando se pueden inmovilizar. El soporte sólido puede ser cualquiera de los sistemas conocidos en biotecnología para inmovilizar células y puede tener la forma de partículas, por ejemplo, láminas, placas, membranas, tubos, columnas, pozos, o micro arreglos fabricados de varios materiales como poliestireno (PS), polimetilmetacrilato (PMMA), polivinil tolueno (PVT), polietileno (PE), o polipropileno (PP). Los materiales adecuados están comercialmente disponibles.
- El soporte sólido usado en el método de la invención es una partícula magnética en la nano- a microescala, además conocida en la materia como perla magnética. El diámetro medio de las perlas puede estar en el intervalo desde 10 nm a 10 µm. Las partículas magnéticas biocompatibles están comercialmente disponibles y consisten de, por ejemplo, formas de óxido de hierro magnéticamente recubiertas por una capa de moléculas de dextrano o sílica. El soporte sólido puede además ser polímeros que contienen materiales magnéticos. Partículas adecuadas están comercialmente disponibles de Miltenyi Biotec GmbH, Alemania bajo el nombre comercial "MicroBeads" y "MACSiBeads" que poseen un diámetro hidrodinámico de 50-100 nm o 3-4 µm, respectivamente.
- El uso del ligando, la molécula de unión a biotina (bbm) y/o el agente de liberación provisto con un medio de detección permite la detección cuantitativa del respectivo compuesto y/o células objetivos y/o la separación o identificación de las células objetivo.
- De acuerdo con esta invención, las partículas magnéticas se usan como soporte sólido para facilitar los procesos de separación magnética. Por ejemplo, la molécula de unión a biotina (bbm) se puede acoplar a una partícula magnética mediante un procesamiento de acoplamiento covalente. En este sentido, las partículas magnéticas podrían actuar como un soporte sólido en protocolos de separación. Las partículas magnéticas adecuadas conjugadas con, por ejemplo anticuerpos anti-biotina y el aparato para las separaciones magnéticas de células vivas están disponibles de Miltenyi Biotec GmbH, Alemania.
- En una variante de la invención, los medios de detección comprenden un anticuerpo, que se usa para unir la molécula de unión a biotina (bbm). Tales medios de detección acoplados al anticuerpo, especialmente perlas magnéticas acopladas a anticuerpos están comercialmente disponibles.
- Esta variante de la invención se ilustra en la fórmula general IV, con el anticuerpo₁ dirigido a una biomolécula de interés, el anticuerpo₂ como molécula de unión a biotina, y el anticuerpo₃, acoplado a medios de detección, como un soporte sólido, unido al anticuerpo₂.

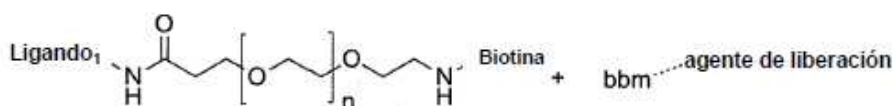


Las perla magnéticas adecuadas acopladas a anticuerpos anti-IgG están comercialmente disponibles de Miltenyi Biotec GmbH como "Anti-IgG MicroBeads".

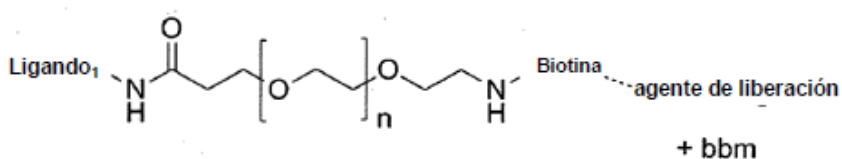
En el método de la invención, el conjugado desprendible se cliva por un agente de liberación como la biotina o la estreptavidina que se proporciona en una concentración suficiente para desplazar la molécula de unión a biotina (bbm) de la porción biotina del ligando biotinilado.

Todas las modalidades y variantes del conjugado desprendible ya descrito se pueden emplear en el método de la invención.

El método de la invención resulta en la disociación del conjugado desprendible entre la porción biotina y el anticuerpo anti-biotina como molécula de unión a biotina (bbm) como se muestra en las figuras V y VI. El conjugado desprendible se cliva selectivamente entre la porción biotina y el anticuerpo anti-biotina por la adición de un exceso de, por ejemplo, biotina libre como agente de liberación. El agente de liberación forma un complejo no-covalente con la molécula de unión a biotina (bbm) y facilita la liberación del ligando biotinilado (V).



Alternativamente, la utilización de un exceso de, por ejemplo, estreptavidina como agente de liberación forma un complejo no-covalente con el ligando biotinilado, que resulta en un desplazamiento de la molécula de unión a biotina (VI).

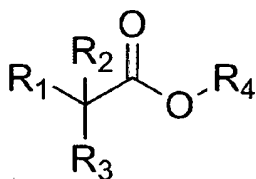


El método de la invención se basa en una reacción de competencia y procederá hasta que se alcance el equilibrio entre el agente de liberación, la molécula de unión a biotina (bbm), y en consecuencia la porción biotina. El equilibrio depende de las fuerzas de unión respectivas, la concentración del agente de liberación libre, y las condiciones termodinámicas de la reacción. En consecuencia, el término "cantidad suficiente para desplazar al segundo ligando por estreptavidina o derivados de esta" no significa un valor específico pero necesita evaluarse de acuerdo con el índice de liberación deseado.

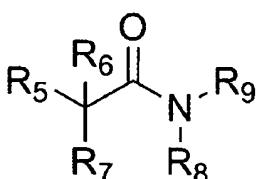
Por ejemplo, al usar un anticuerpo anti-biotina como molécula de unión a biotina (bbm) el conjugado desprendible de la invención se puede clivar selectivamente por el uso de biotina o estreptavidina libre como agente de liberación. Si se usa biotina libre como agente de liberación, una relación molar (ligando biotinilado: biotina libre) de 1:1,000 a 1:1,000,000, preferentemente una relación molar de 1:1,000 a 1:100,000 es suficiente para disociar el conjugado desprendible. En el caso de la estreptavidina como agente de liberación, una relación molar (ligando

biotinilado:estreptavidina) de 1:1 a 1:10,000 preferentemente 1:10 a 1:1,000 se puede proporcionar para disociar el conjugado desprendible.

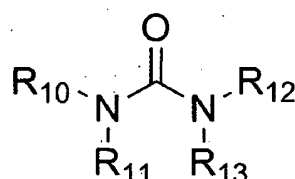
En otra modalidad del método de la invención, se encontró que la adición de un agente de liberación auxiliar mejora la eficiencia de liberación del método de la invención. En esta modalidad, el agente de liberación y un agente de liberación auxiliar se proporcionan en una concentración suficiente para desplazar la molécula de unión a biotina (bbm) de la porción biotina del ligando biotinilado. Agentes de liberación auxiliares adecuados tienen las fórmulas generales VII, VIII, o IX



VII



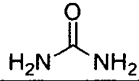
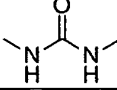
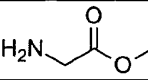
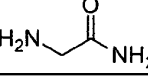
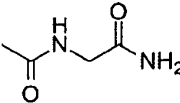
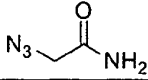
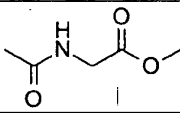
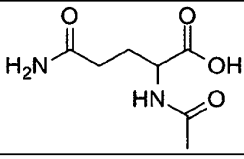
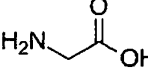
VIII



IX

con $\text{R}_{1-3,5-13}$ = igual o diferente hidrógeno, residuos alquilo sustituidos, o no sustituidos que tienen 1-20 átomos de carbono y R_4 = residuos alquilo sustituidos, o no sustituidos que tienen 1-20 átomos de carbono.

Los siguientes compuestos 7-15 ilustran ejemplos específicos de agentes de liberación auxiliares de acuerdo con la invención. No adecuado como agente de liberación auxiliar de acuerdo con la invención es, por ejemplo, el compuesto 15, a pesar de su estructura molecular similar en comparación a los compuestos 7 -14.

No.	Estructura química
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	

En esta variante de la invención, la persona con experiencia en la materia puede evaluar fácilmente la concentración adecuada del agente de liberación auxiliar con respecto a la velocidad de liberación deseada. Los ejemplos proporcionan algunos puntos de vista con respecto a condiciones adecuadas y eficiencias de liberación resultantes. En la práctica, el agente de liberación auxiliar se puede usar en un gran exceso en comparación con el agente de liberación, por ejemplo con una relación molar de 1:1,000 a 1:1,000,000 (agente de liberación:agente de liberación auxiliar).

Todas las variantes del conjugado desprendible ya descritas se pueden emplear en el método de la invención.

Opcionalmente, posterior a la etapa c), en una etapa adicional d) la molécula de unión a biotina (bbm) se separa de las células objetivo. Las células objetivo se pueden marcar todavía con el conjugado de acuerdo con la Fórmula general I después de la separación.

El método de acuerdo con la invención incluye en la etapa c) y opcionalmente en la etapa d) una separación de las células marcadas. Para este fin, la molécula de unión a biotina del conjugado desprendible comprende una perla magnética como soporte sólido y la etapa de separación se realiza por la aplicación de un campo magnético. Las personas con experiencia en la materia conocen la clasificación de células magnéticas y se puede llevar a cabo en un campo permanente o electromagnético con o sin el uso de una columna ferromagnética que contenga material ferromagnético. Las columnas que contienen material ferromagnético mejoran el gradiente del campo magnético y están disponibles de Miltenyi Biotec GmbH, Alemania.

En la invención, las células marcadas magnéticamente se separan de las células no magnéticas (es decir, no marcadas) al aplicar un campo magnético. Después de la separación, el marcador magnético se puede eliminar al añadir biotina o

estreptavidina con o sin un agente de liberación auxiliar en una concentración suficiente para desplazar la molécula de unión a biotina (bbm) en la etapa c).

Esta etapa de liberación se puede realizar dentro o fuera del campo magnético. Por ejemplo, las células con marcadores magnéticos se pueden lavar a partir de la columna y conseguir que se elimine el marcador magnético fuera del campo magnético. Alternativamente, las células marcadas magnéticamente se pueden desmarcar al añadir el agente de liberación a la columna situada en el campo magnético. En esta variante, las células objetivo (con el conjugado) se eluyen a partir de la columna/los campos magnéticos mientras el marcador magnético permanece en la columna y en el campo magnético.

En la etapa opcional d), es decir, la separación de la molécula de unión a biotina (bbm) de las células objetivo se puede lograr por centrifugación o preferentemente por aplicación de un campo magnético, es decir, por la técnica de clasificación de células magnéticas como ya se describió. Las etapas c) y d) se llevan a cabo preferentemente en al menos una (la misma) o especialmente en dos columnas diferentes que contienen material ferromagnético.

Especialmente para la detección cuantitativa de las células objetivo dentro del método de la invención, el ligando y/o la molécula de unión a biotina (bbm) pueden comprender preferentemente un cromóforo o una unidad de fluorescencia como medio de detección. El medio de detección del ligando y/o la molécula de unión a biotina (bbm) se detecta posterior a la etapa c) para detectar las células objetivo. Las personas con experiencia en la materia conocen los métodos para la detección celular, por ejemplo, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

EJEMPLOS

Los ejemplos y los ejemplos comparativos muestran que el método de acuerdo con la invención permite una disociación rápida y fiable. Las células fijadas como objetivo por los conjugados desprendibles se pueden separar a partir de suspensiones celulares y se liberan eficientemente, lo que hace posible un procesamiento adicional de las células aisladas.

Ejemplo 1 - Acoplamiento de los conjugados anti-CD8-biotina y tinción de la superficie celular:

Protocolo 1 de acoplamiento:

Para preparar los conjugados de acuerdo con la primera modalidad, el anticuerpo anti-CD8 IIa en amortiguador PBS/EDTA se re-amortiguó a amortiguador NaHCO_3 100 mM (pH 8.3). NHS-biotina, NHS-LC-biotina, NHS-LC-LC-biotina, y NHS-PEO-biotina ($n=4$, como se muestra en la Figura 1, disponibles de Thermo Scientific/Pierce) se disolvieron en DMSO a concentración de 5 mg/ml y se añadieron en diferentes relaciones molares a la solución de anticuerpo a 2.5 mg/ml. Después de 1 h de tiempo de incubación a temperatura ambiente, la biotina que no reaccionó se eliminó por filtración de gel que utilizó amortiguador PBS/EDTA. Las concentraciones de proteína se determinaron por absorbancia a 280 nm. Las relaciones aproximadas de biotina a proteína (B/P) se determinaron por el ensayo normalizado de avidina-HABA.

Protocolo 2 de acoplamiento:

Para preparar bioconjugados de acuerdo con la segunda modalidad el anticuerpo anti-CD8 IIb o IIc se redujo con DTT 10 mM en amortiguador MES. Después de 1 h de tiempo de incubación a temperatura ambiente, el anticuerpo se purificó por filtración de gel que utilizó amortiguador PBS/EDTA. Para proporcionar los conjugados anti-CD8- PEO_4 -biotina (5) (de acuerdo con IIb) y anti-CD8- PEO_2 -biotina (6) (de acuerdo con IIc), maleimida- PEO_4 -biotina o maleimida- PEO_2 -biotina (disponibles de Thermo Scientific/Pierce), respectivamente, se disolvieron en amortiguador PBS/EDTA a 5 mg/ml y se añadieron con un exceso molar a la solución de anticuerpo a 2.5 mg/ml. Después de 15 h de incubación a temperatura ambiente, la biotina que no reaccionó se eliminó por filtración de gel que utilizó amortiguador PBS/EDTA. Las concentraciones de proteína se determinaron por absorbancia a 280 nm. Las relaciones aproximadas de biotina a proteína (B/P) se determinaron por el ensayo normalizado de avidina-HABA.

Tinción de la superficie celular con conjugados anti-CD8-biotina: células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en amortiguador PBS/EDTA/BSA se tiñeron durante 10 min a 4 °C con 0.5 µg/ml de anti-CD8-biotina (1), anti-CD8-LC-biotina (2), anti-CD8-LC-LC-biotina (3), o anti-CD8-PEO-biotina (4) como se ilustra en la Figura 1. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se tiñeron durante 10 min a 4 °C con un exceso de anti-biotina-PE. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se analizaron por citometría de flujo.

La Figura 2 muestra las intensidades de fluorescencia media que se lograron con diferentes conjugados anti-CD8-biotina en función de la relación B/P. La tinción de la superficie celular con anti-CD8-LC-biotina (2), anti-CD8-LC-LC-biotina (3), o anti-CD8-PEO-biotina (4) proporcionó igualmente señales de fluorescencia. En contraste, las células teñidas con anti-CD8-biotina (1) que les faltaba una molécula espaciadora entre la biotina y la porción del anticuerpo

proporcionada disminuyó la intensidad de fluorescencia media aunque la relación B/P del conjugado fue comparable a los otros anticuerpos biotinilados. Estos experimentos ilustraron la ventaja de los sistemas de afinidad que contienen moléculas espaciadoras como en el anti-CD8-LC-biotina (2), anti-CD8-LC-LC-biotina (3), o anti-CD8-PEO-biotina (4) en comparación con conjugados, como anti-CD8-biotina (1) que le falta un enlazador adicional entre la biotina y la porción de anticuerpo.

Ejemplo 2 - Tinción de la superficie celular con el conjugado anti-CD8-biotina y análisis cinético:

Las PBMCs en amortiguador PBS/EDTA/BSA se tiñeron durante 10 min a 4 °C con 0.5 µg/ml de anti-CD8-biotina (1), anti-CD8-LC-biotina (2), anti-CD8-LC-LC-biotina (3), anti-CD8-PEO-biotina (4), anti-CD8-PEO-biotina (5), o anti-CD8-PEO₂-biotina (6). Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se tiñeron durante 10 min a 4 °C con un exceso de anti-biotina-PE. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se incubaron con biotina 0.1 mM a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células y la disociación de anti-biotina-PE se controló por análisis de citometría de flujo después de ciertos puntos de tiempo en relación con la muestra de partida que le faltaba el agente de liberación.

La Figura 3 ilustra una rápida disminución de la señal de fluorescencia de las células CD8 positivas dentro de los primeros 10 min de tiempo de reacción en presencia de anti-CD8-biotina (1), anti-CD8-PEO-biotina (4), anti-CD8-PEO-biotina (5), o anti-CD8-PEO₂-biotina (6), mientras la velocidad de disociación en el caso del anti-CD8-LC-biotina (2) y anti-CD8-LC-LC-biotina (3) fue significativamente más lenta. Estos ejemplos muestran que la liberación de conjugados que comprenden ya sea la molécula no espaciadora o unidades espaciadoras de acuerdo con la invención es mucho más rápida que con conjugados que comprenden una molécula espaciadora que esté de acuerdo con la invención, como LC o LC-LC. Es importante notar que, las moléculas espaciadoras parecen ser necesarias para lograr igualmente la tinción celular como ya se describió en la Figura 2.

Ejemplo 3 - Tinción de la superficie celular con el conjugado anti-CD8-PEO-biotina y análisis cinético:

Las células CD8 positivas se tiñeron en amortiguador PBS/EDTA/BSA durante 10 min a 4 °C con 0.5 µg/ml de anti-CD8-PEO-biotina (4). Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se tiñeron 10 min a 4 °C con un exceso de anti-biotina-PE. Las células se lavaron con PBS/EDTA/BSA frío y se incubaron con diferentes concentraciones de los compuestos 10, 12, y 15 a temperatura ambiente en la oscuridad. La disociación del sistema anti-CD8-PEO-biotina/anti-biotina-PE se controló por análisis de citometría de flujo después de 10 min de tiempo de incubación en relación a muestras que les falta el agente de liberación.

La Figura 4 ilustra que los compuestos 10 y 12 facilitan altamente la disociación del sistema anti-CD8-PEO-biotina/anti-biotina-PE en comparación a la molécula 15, que proporciona rendimientos de liberación inferiores. Estos ejemplos muestran que los agentes de liberación auxiliares de acuerdo con la invención pueden facilitar la disociación de la liberación inventada.

Ejemplo 4 - Tinción de la superficie celular con conjugados anti-CD8-biotina y análisis cinético:

Las células CD8 positivas se tiñeron en amortiguador PBS/EDTA/BSA durante 10 min a 4 °C con 0.5 µg/ml de anti-CD8-LC-LC-biotina (3) y anti-CD8-PEO-biotina (4). Las células se lavaron con PBS/EDTA/BSA frío y se tiñeron durante 10 min a 4 °C con un exceso de anti-biotina-PE. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se incubaron con diferentes cantidades de estreptavidina en ausencia o en conjunto con el compuesto 12 a concentración de 100 mM. La disociación de los sistemas anti-CD8-PEO-biotina/anti-biotina-PE y anti-CD8-LC-LC-biotina/anti-biotina-PE se controló por análisis de citometría de flujo después de 10 min de tiempo de incubación en relación a muestras que les faltaba el agente de liberación.

La Figura 5 muestra que el sistema anti-CD8-PEO-biotina/anti-biotina-PE se disocia considerablemente más rápido que el sistema anti-CD8-LC-LC-biotina/anti-biotina-PE en presencia de estreptavidina. Más aún, la adición del compuesto 12 como agente de liberación auxiliar acelera el proceso de disociación mediado por estreptavidina. Este ejemplo muestra que la estreptavidina por sí misma y en conjunto con el compuesto 12 como agente de liberación auxiliar pueden facilitar la disociación de los conjugados que contienen una molécula espaciadora de acuerdo con la invención. En contraste, la disociación de los sistemas de afinidad que poseen una molécula espaciadora que no está de acuerdo con la invención, como LC-LC, está considerablemente menos influenciado por la utilización de agentes de liberación.

Ejemplo 5 - Tinción de la superficie celular con conjugados anti-CD8-biotina y análisis cinético:

Las células CD8 positivas se tiñeron en amortiguador PBS/EDTA/BSA durante 10 min a 4 °C con 0.5 µg/ml de anti-CD8-LC-LC-biotina (3) y anti-CD8-PEO-biotina (4). Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se tiñeron durante 10 min a 4 °C con un exceso de anti-biotina-PE. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA y se incubaron con diferentes concentraciones de alofocianina (APC)-marcada con estreptavidina (Biolegend, Inc.) en

ausencia o en conjunto con el compuesto 12. La disociación de los sistemas anti-CD8-PEO-biotina/anti-biotina-PE y anti-CD8-LC-LC-biotina/anti-biotina-PE se controlaron por análisis de citometría de flujo después de 10 min de tiempo de incubación en relación a muestras que les faltaba el agente de liberación.

La Figura 6 muestra que el sistema anti-CD8-PEO-biotina/anti-biotina-PE se disocia considerablemente más rápido que el sistema anti-CD8-LC-LC-biotina/anti-biotina-PE en presencia de APC-estreptavidina. Más aún, la adición del compuesto 12 como agente de liberación auxiliar acelera el proceso de disociación mediado por APC-estreptavidina. Este ejemplo muestra que la APC-estreptavidina por sí misma y en conjunto con el compuesto 12 como agente de liberación auxiliar pueden facilitar la disociación de los conjugados desprendibles que contienen una molécula espaciadora de acuerdo con la invención. En contraste, los agentes de liberación influyen considerablemente menos en la disociación de los sistemas de afinidad que poseen una molécula espaciadora que no está de acuerdo con la invención, como el sistema anti-CD8-LC-LC-biotina/anti-biotina-PE.

Ejemplo 6 - Separación de células magnéticas con el conjugado anti-CD8-PEO-biotina:

Las PBMCs se incubaron en amortiguador PBS/EDTA/BSA a 4 °C durante 10 min con anti-CD8-LC-LC-biotina (3) y anti-CD8-PEO-biotina (4). Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se incubaron durante 15 min a 4 °C con microperlas anti-biotina (Miltenyi Biotec GmbH) y durante 5 min a 4 °C con anti-CD8-PE. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se resuspendieron en 500 µl de amortiguador frío. La suspensión celular se aplicó en una columna MS (Miltenyi Biotec GmbH) en un campo magnético para la separación de las células magnéticas. El flujo se recogió como la fracción celular no marcada magnéticamente. Las células se lavaron dentro del campo magnético y la columna se retiró del separador antes de la elución de las células con 1 ml de amortiguador PBS/EDTA/BSA frío. La fracción de células aisladas se incubó durante 10 min a diferentes concentraciones de biotina. La suspensión celular se aplicó en una segunda columna y el flujo se recogió como células eluidas. Las células retenidas en la columna se eluyeron con 500 µl de amortiguador PBS/EDTA/BSA frío en ausencia del campo magnético. La cantidad de células CD8 positivas en las fracciones aisladas se determinó por análisis de citometría de flujo. El porcentaje del reparto de las células eluidas se calculó como sigue:

cantidad de células en la fracción eluida

cantidad de células en la fracción eluida + cantidad de células en la fracción retenida por el campo magnético

La Figura 7 ilustra que la incubación de las células marcadas por el sistema anti-CD8-PEO-biotina/microperlas anti-biotina de acuerdo con la invención con biotina conduce a una liberación del marcador magnético considerablemente mejor en comparación con el sistema anti-CD8-LC-LC-biotina/microperlas anti-biotina. Este ejemplo muestra la posibilidad de liberar eficientemente el marcaje magnético de las células separadas en el sistema anti-CD8-PEO-biotina/microperlas anti-biotina por la adición de biotina como agente de liberación.

Ejemplo 7 - Separación de células magnéticas con el conjugado anti-CD8-PEO-biotina:

Las PBMCs se incubaron en amortiguador PBS/EDTA/BSA durante 10 min a 4 °C con anti-CD8-LC-LC-biotina (3) y anti-CD8-PEO-biotina (4). Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se incubaron durante 15 min a 4 °C con microperlas anti-biotina (Miltenyi Biotec GmbH) y durante 5 min a 4 °C con anti-CD8-PE. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se resuspendieron en 500 µl de amortiguador frío. La suspensión celular se aplicó en una columna MS en un campo magnético para la separación de las células magnética. El flujo se recogió como la fracción celular no marcada magnéticamente. Las células se lavaron dentro del campo magnético y la columna se retiró del separador antes de la elución de las células con 1 ml de amortiguador PBS/EDTA/BSA frío. La fracción celular se incubó durante 10 min a diferentes concentraciones de estreptavidina con y sin el compuesto 12. La suspensión celular se aplicó en una segunda columna y se recogió como células eluidas. Las células retenidas en la columna se eluyeron con 500 µl de amortiguador PBS/EDTA/BSA frío en ausencia del campo magnético. La cantidad de células CD8 positivas en las fracciones aisladas se determinó por análisis de citometría de flujo. El porcentaje de reparto de las células eluidas se calculó como sigue:

cantidad de células en la fracción eluida

cantidad de células en la fracción eluida + cantidad de células en la fracción retenida por el campo magnético

La Figura 8 ilustra que la incubación de las células marcadas por el sistema anti-CD8-PEO-biotina/microperlas anti-biotina de acuerdo con la invención con estreptavidina proporciona una liberación del marcador magnético considerablemente más rápida en comparación con el sistema anti-CD8-LC-LC-biotina/microperlas anti-biotina. Más aún, la adición del compuesto 12 a la estreptavidina como agente de liberación mejora adicionalmente la disociación del sistema CD8-PEO-biotina/microperlas anti-biotina. Este ejemplo muestra que el uso de un agente de liberación auxiliar de acuerdo con la invención puede mejorar considerablemente la eficiencia de liberación.

Ejemplo 8 - Separación de células magnéticas con el conjugado anti-CD8-PEO-biotina:

Las PBMCs se incubaron en amortiguador PBS/EDTA/BSA durante 10 min a 4 °C con anti-CD8-LC-LC-biotina (3) y anti-CD8-PEO-biotina (4). Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se incubaron durante 15 min a 4 °C con microperlas anti-biotina y durante 5 min a 4 °C con anti-CD8-PE. Las células se lavaron con amortiguador PBS/EDTA/BSA frío y se resuspendieron en 500 µl de amortiguador frío. La suspensión celular se aplicó en una columna MS en un campo magnético para la separación de las células magnética. El flujo se recogió como la fracción celular no marcada magnéticamente. Las células se lavaron dentro del campo magnético y la columna se retiró del separador antes de la elución de las células con 1 ml de amortiguador PBS/EDTA/BSA frío. La fracción celular se incubó durante 10 min a diferentes concentraciones de APC-estreptavidina con y sin el compuesto 12. La suspensión celular se aplicó en una segunda columna y el flujo se recogió como células eluidas. Las células retenidas en la columna se eluyeron con 500 µl de amortiguador PBS/EDTA/BSA frío en ausencia del campo magnético. La cantidad de células CD8 positivas en las fracciones aisladas se determinó por análisis de citometría de flujo. El porcentaje de reparto de las células eluidas se calculó como sigue:

cantidad de células en la fracción eluida

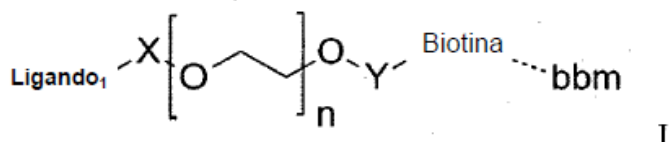
cantidad de células en la fracción eluida + cantidad de células en la fracción retenida por el campo magnético

La Figura 9 ilustra que las células marcadas por el sistema anti-CD8-PEO-biotina/microperlas anti-biotina de acuerdo con la invención y tratadas con APC-estreptavidina como agente de liberación se eluyen considerablemente más rápido del campo magnético en comparación con las células marcadas con el sistema anti-CD8-LC-LC-biotina/microperlas anti-biotina. Más aún, la adición del compuesto 12 a la APC-estreptavidina como agente de liberación mejora adicionalmente la disociación del sistema CD8-PEO-biotina/microperlas anti-biotina. Estos resultados demuestran que el uso del agente de liberación auxiliar de acuerdo con la invención puede mejorar considerablemente la eficiencia de liberación.

Reivindicaciones

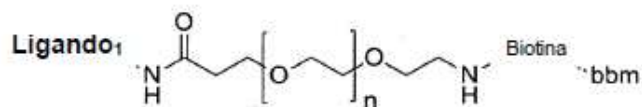
1. Método para la separación de células objetivo a partir de una muestra de células que comprende las etapas:

- a) incubar la muestra de células con un conjugado desprendible que comprende un ligando biotinilado que tiene una porción biotina, una porción ligando (Ligando₁) y una molécula de unión a biotina (bbm) unida a la porción biotina del ligando biotinilado, en donde la porción biotina y la porción ligando del ligando biotinilado están separadas por un grupo espaciador que consiste en polietilenglicol de acuerdo con la Fórmula general I

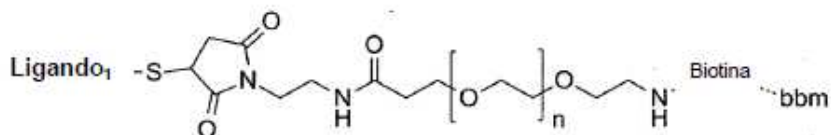


con $n = 1 - 500$, y X, Y = iguales o diferentes, grupos alquilo sustituido que tienen 1 a 20 átomos de carbono con residuos amina, amida, y/o tioéter, en donde el ligando es un primer anticuerpo para el que las células objetivo expresan un antígeno, y la molécula de unión a biotina (bbm) es un segundo anticuerpo que comprende una partícula magnética como soporte sólido,

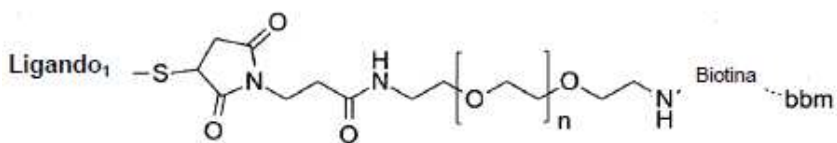
- b) separar las células marcadas con el soporte sólido obtenido en la etapa a) a partir de la muestra de célula al aplicar un campo magnético,
- c) añadir un agente de liberación en una concentración suficiente para desplazar la molécula de unión a biotina (bbm) de la porción biotina del ligando biotinilado.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado porque** posterior a la etapa c), en una etapa opcional d) la molécula de unión a biotina (bbm) se separa de las células objetivo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2 **caracterizado porque** la etapa d) se lleva a cabo al aplicar un campo magnético.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado porque** la etapa b) y c) se llevan a cabo en al menos una columna que contiene material ferromagnético.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado porque** el ligando comprende una unidad cromófora, una unidad de fluorescencia, o una unidad radioactiva como medios de detección.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado porque** los medios de detección del ligando y/o la molécula de unión a biotina (bbm) se detectan posterior a la etapa c) para detectar las células objetivo.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado porque** el ligando es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido contra el antígeno expresado intracelular o extracelular.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el conjugado desprendible tiene la Fórmula general IIa, IIb, o IIc



IIa

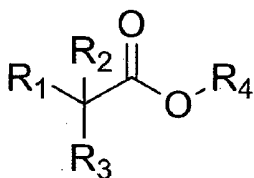


IIb

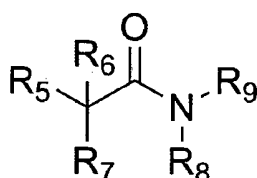


IIc

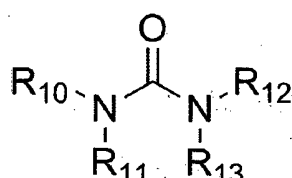
- 25
- 30
- 35
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el agente de liberación es biotina o estreptavidina.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 **caracterizado porque** en la etapa c), un agente de liberación auxiliar que tiene las Fórmulas generales VII, VIII, o IX



VII



VIII



IX

45

50

con $R_{1-3,5-13}$ = el mismo o diferente hidrógeno, o residuos alquilo sustituido o no sustituido que tienen 1 - 20 átomos de carbono y R_4 = residuos alquilo sustituido o no sustituido, que tienen 1 - 20 átomos de carbono se proporciona adicionalmente.

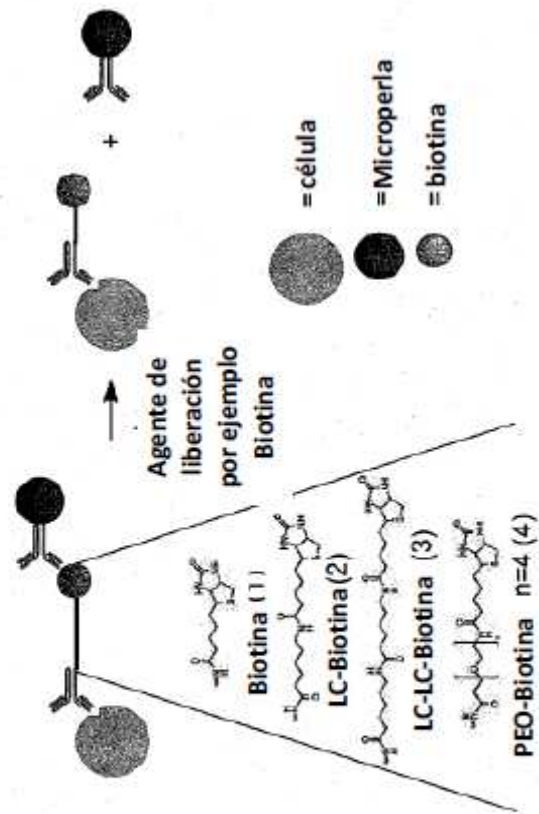


Figura 1

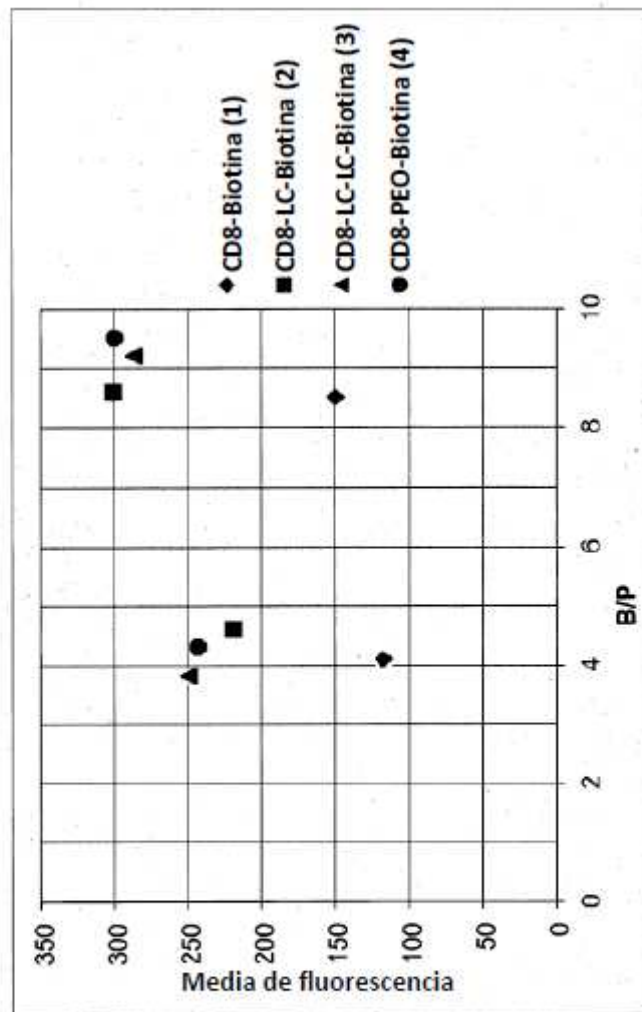


Figura 2

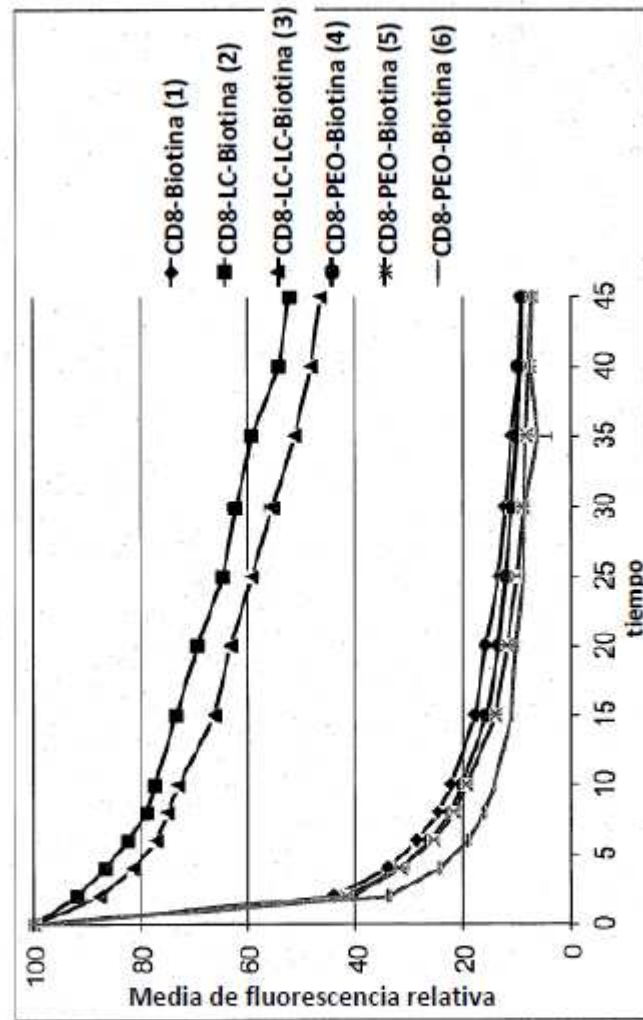


Figura 3

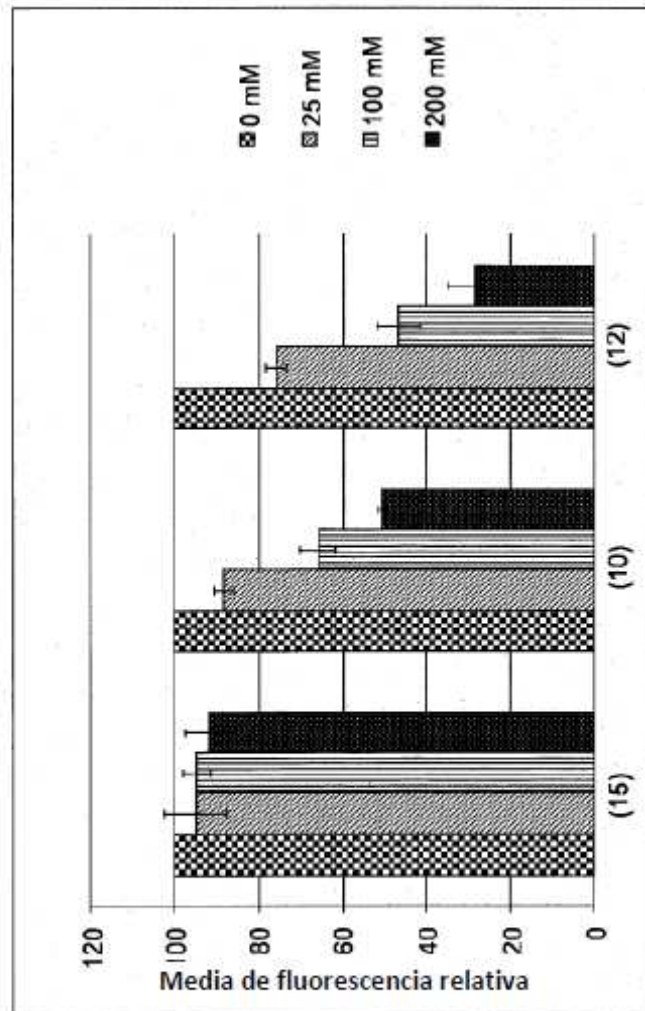


Figura 4

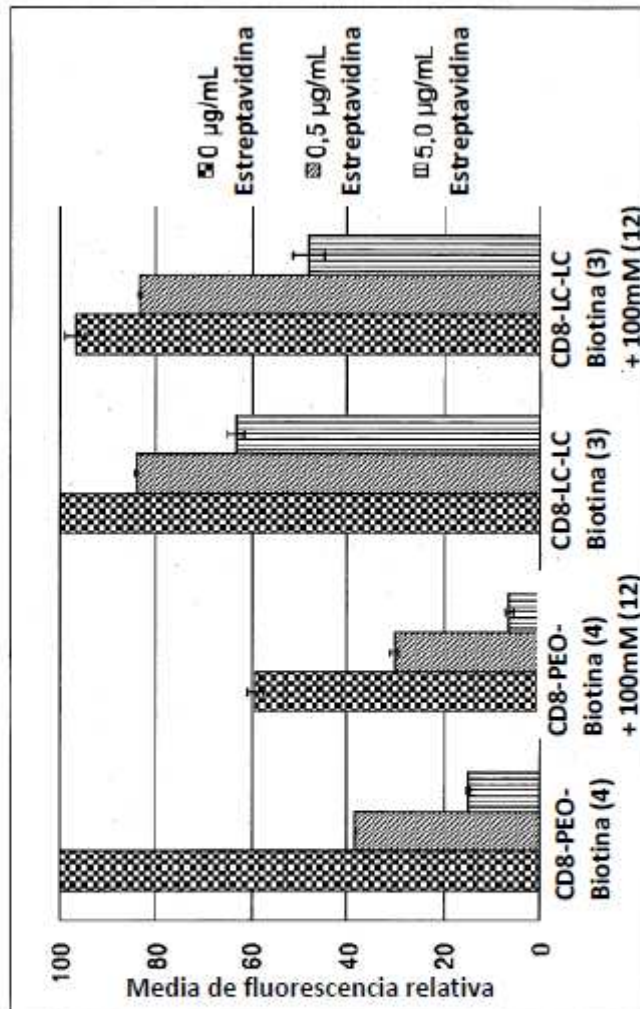


Figura 5

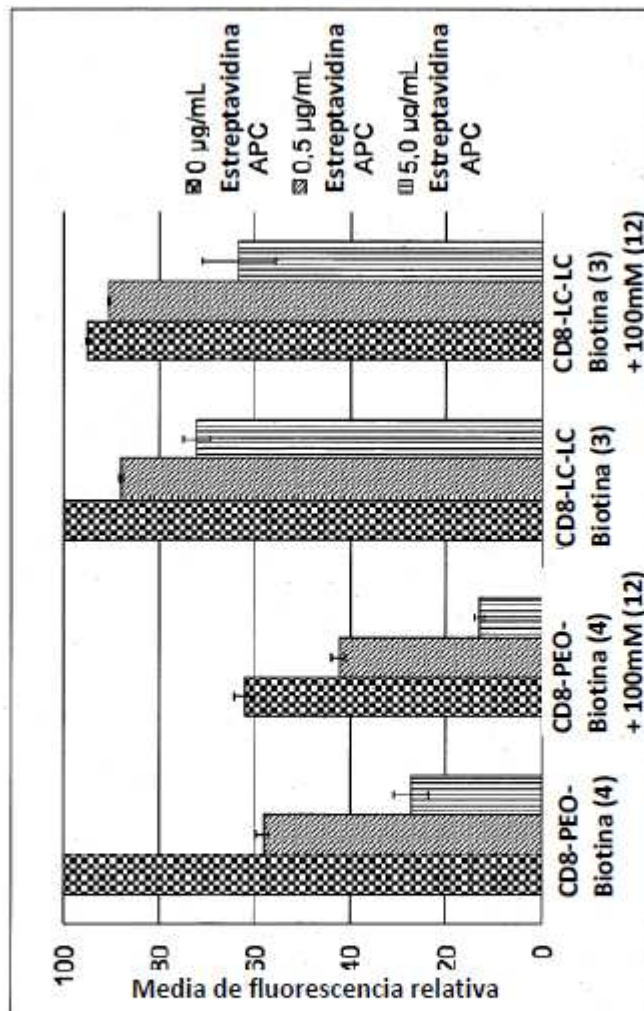


Figura 6

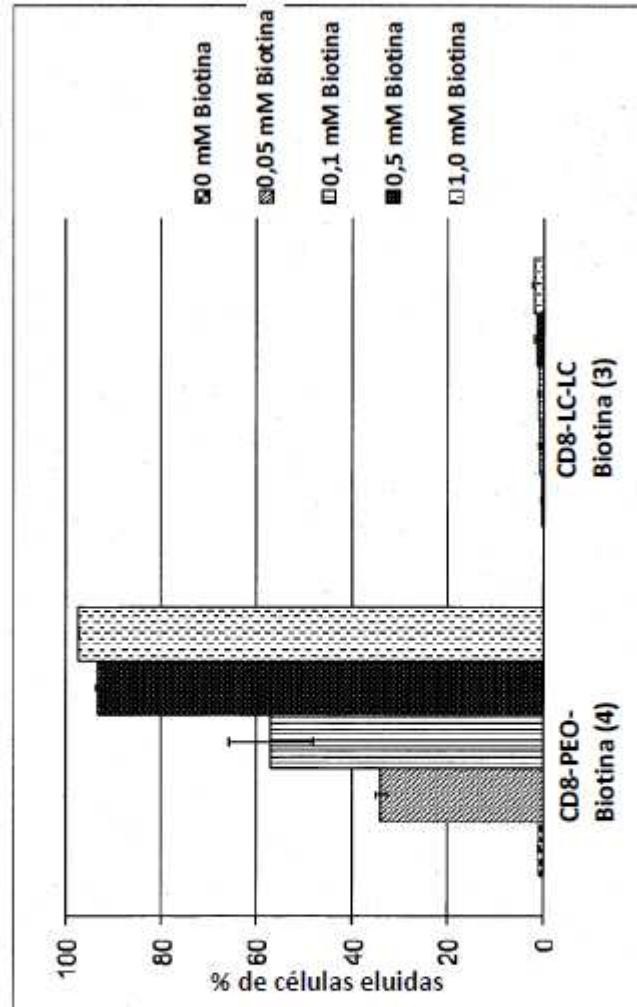


Figura 7

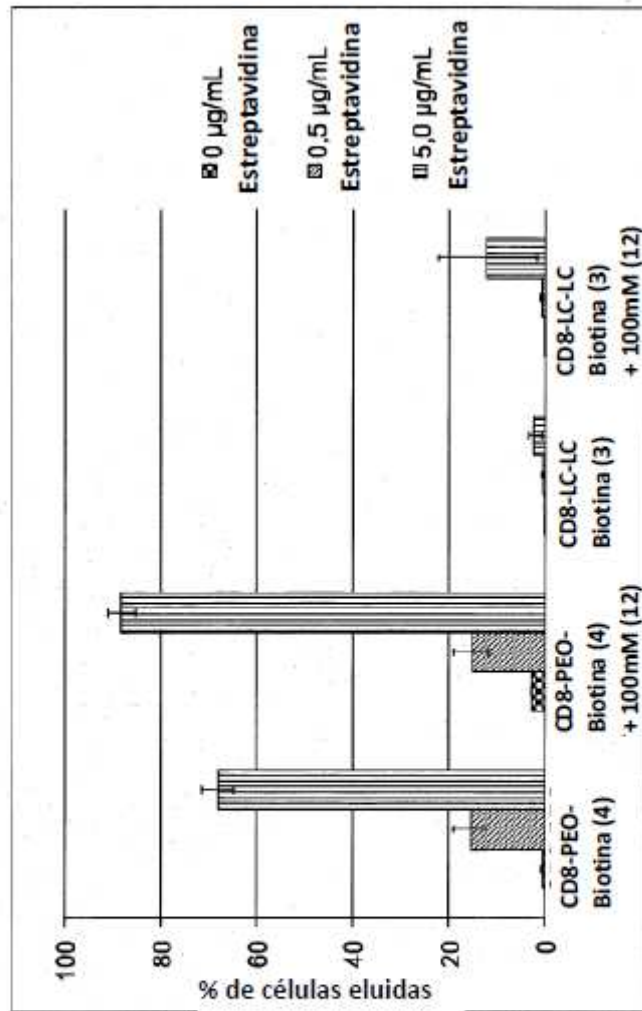


Figura 8

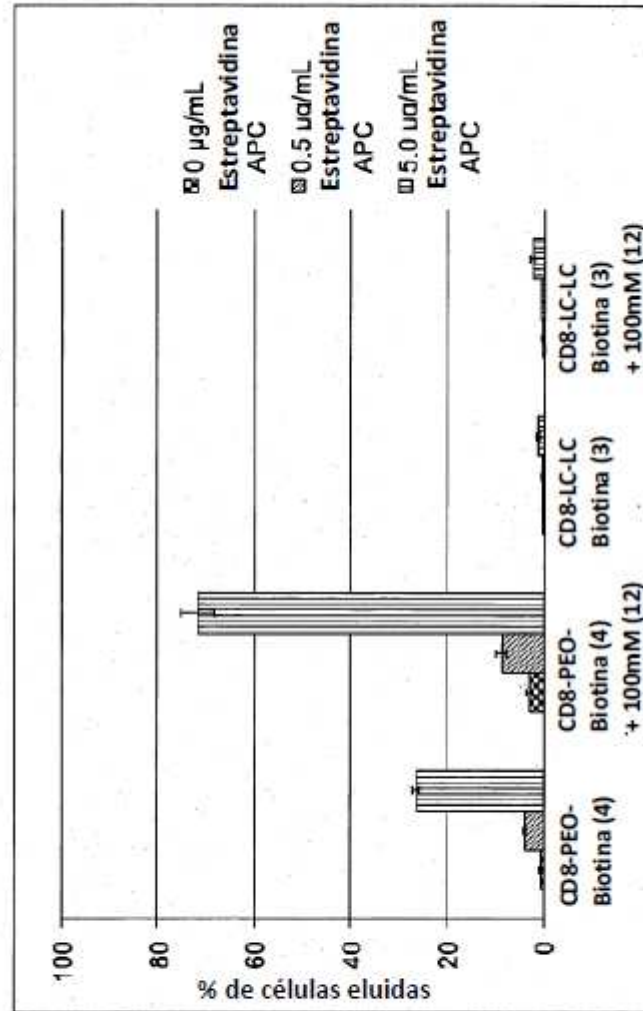


Figura 9