

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 844**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C40B 30/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2012 PCT/IB2012/003117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14087191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2012 E 12889551 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2786147**

54 Título: **Procedimiento para la selección de un conjunto de moléculas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2017**

73 Titular/es:

**SCINOPHARM TAIWAN LTD. (50.0%)  
No. 1, Nan-ke 8th Road Tainan Science Park  
Shan-hua, Tainan 74144, TW y  
NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHAN, HARDY, W. y  
HUANG, CHI-YING**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 621 844 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la selección de un conjunto de moléculas

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para la selección de un conjunto de anticuerpos. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para la selección de un grupo de anticuerpos que tienen alta selectividad para ciertos marcadores biológicos de interés.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0002]** Las interacciones entre moléculas son necesarias para todas las biorreacciones. Las interacciones entre anticuerpos y antígenos, y ligandos y receptores son cruciales para iniciar una serie de vías de respuesta a estímulos externos. La identificación de una molécula específica implicada en las interacciones es muy importante para la investigación y desarrollo farmacéutico.

15 **[0003]** Por ejemplo, después de la finalización del proyecto genómico humano, se han identificado la mayoría de los genes expresados humanos. Sin embargo, en la era de la proteómica emergente, las proteínas actúan como actores clave en el descubrimiento de estos genes. Con el fin de descifrar eficazmente el misterio de estas proteínas, se han adoptado muchos esfuerzos para generar al menos un anticuerpo para cada gen expresado humano en el genoma humano. Los anticuerpos con su sensibilidad y especificidad inherentes se convierten por lo tanto en las herramientas más versátiles para proporcionar una relación uno-a-uno con sus proteínas diana. Sin embargo, una de las complejidades es que estas proteínas no siempre se comportan de la misma manera cuando se colocan en células diferentes (por ejemplo, cáncer). Muchas proteínas son conocidas por su capacidad de translocación en diferentes contextos celulares; así los correspondientes anticuerpos reconocerán ubicaciones distintas en una célula determinada. Además, en muchos casos, las translocaciones de proteínas están implicadas en la activación de las células tumorales. La detección de los movimientos podría ayudar a diagnosticar el tipo y la etapa del cáncer en el futuro. La estrategia de alto rendimiento con la selección directa de antígeno en la membrana celular puede permitir el descubrimiento de dianas terapéuticas potenciales y nuevos marcadores de la enfermedad.

20 **[0004]** Sin embargo, aunque se han generado numerosos anticuerpos útiles, las principales limitaciones son dos, es decir, (1) cómo descubrir directamente antígenos específicos (por ejemplo, marcadores de membrana o de superficie) en una célula determinada y (2) cómo identificar rápidamente los anticuerpos valiosos que reconocen estos antígenos.

35 **[0005]** Tomando las proteínas de membrana como ejemplo, muchas proteínas de membrana están implicadas en estados patológicos particulares, tales como cáncer de pulmón, y a menudo son atractivas dianas terapéuticas. El perfil sistemático y cuantitativo de proteínas de membrana puede facilitar nuestra comprensión de sus papeles en la regulación de procesos biológicos en diversos estados patológicos. Aproximadamente del 20 al 30% de los marcos de lectura abiertos de los genomas más secuenciados se estima que codifican proteínas integrales de membrana (Blonder, J., et al., Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2002. 1 (4): pág. 351-360; Han, DK, et al, Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 2001. 19 (10): pág. 946-951). Sin embargo, el proteoma de membrana no se ha mapeado y es un reto experimental debido a la baja abundancia de proteínas de membrana. Además, utilizando la proteómica de alto rendimiento y estudios de cribado basados en microarrays, las nuevas dianas identificadas a menudo carecen de anticuerpos para la caracterización de su ubicación y función, evitando además que los investigadores persigan posibles proteínas de membrana. Es esencial un procedimiento para obtener el perfil de expresión directa para identificar anticuerpos y reconocer receptores (marcadores de superficie o proteínas asociadas a la membrana).

40 **[0006]** El cribado aleatorio conlleva mucho tiempo y por lo general es impracticable debido a las diversas condiciones fisiológicas. El uso de anticuerpos individuales para cribar nuevos receptores es imposible debido a la exigencia de más de 25000 anticuerpos para cubrir todo el genoma. Por otra parte, las células cancerosas a menudo tienen múltiples receptores sobreexpresados y distintos tipos de células que pueden tener diferentes perfiles de ubicación para la misma proteína diana. Por lo tanto, es necesario desarrollar un procedimiento rápido y eficaz para abordar estas cuestiones al mismo tiempo.

50 **[0007]** El documento US 2011/236957 A1 da a conocer composiciones y procedimientos para marcar dianas biológicas utilizando un conjugado de un componente luminiscente y una molécula de reconocimiento unida a una estructura de núcleo de nanopartículas. Los conjugados de marcaje ofrecen una alta intensidad y bajo ruido de fondo para aplicaciones en la histología y patología. El procedimiento comprende: proporcionar una diana biológica para marcar; e incubar la diana biológica con una composición de marcaje de un solo reactivo que comprende (i) una estructura de núcleo de nanopartículas, (ii) una molécula de reconocimiento específica para la diana biológica, y (iii) al menos un componente luminiscente, en el que la incubación consigue el marcaje de la diana biológica con la composición de marcaje de un solo reactivo.

[0008] El documento US 2010/119593 A1 da a conocer un liposoma que incluye una membrana de lípidos neutros, un polímero cargado positivamente, y un polímero activo de superficie, en el que la membrana de lípidos neutros está formada como una esfera hueca, el polímero cargado positivamente está dispersado en la membrana de lípidos neutros por unión no covalente, y el polímero activo de superficie está dispersado en la membrana de lípidos neutros mediante unión no covalente. El liposoma puede de forma estable adsorber diversas cantidades de biomateriales mediante unión no covalente.

[0009] OBRIST ET AL: "Monoclonal antibodies as drug carriers in oncology" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARTH, GB, vol. 4, 1 de enero de 1983 (1983-01-01), páginas 375-379, ISSN: 0165-6147,001: 10.1016/0165-6147 (83) 90452-2 da a conocer un procedimiento para detectar una línea celular de hibridoma de un grupo de células de hibridoma que produce un anticuerpo deseado.

[0010] YEN-KU L1U ET AL: "A unique and potent protein binding nature of liposome containing polyethylenimine and polyethylene Glycol: A nondisplaceable property", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 108, no. 6, 27 junio 2011 (27-06-2011), páginas 1318-1327, describe la carga de un conjunto de moléculas (anticuerpos en general) de un vehículo configurado como liposoma de LPPC, y el reconocimiento de su afinidad de unión vis a vis una diana.

[0011] Carol M Y Lee et al. (Nature Protocols, Vol, No. 11, 2007) describe uno de los procedimientos conocidos para la selección de un conjunto de anticuerpos mediante el uso de presentación en fagos.

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0012] Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado de cribado de expresión de un grupo pequeño para la selección de un grupo de anticuerpos que tienen alta selectividad para ciertos marcadores biológicos de interés.

[0013] Este problema se resuelve mediante un procedimiento para la selección de un conjunto de anticuerpos como se reivindica en la reivindicación 1. Otras realizaciones ventajosas son la materia objeto de las reivindicaciones dependientes.

[0014] Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para seleccionar un conjunto de moléculas que comprenden: a) proporcionar un conjunto de anticuerpos; b) dividir el conjunto de anticuerpos en múltiples subconjuntos; c) cargar cada uno de los subconjuntos en un liposoma para formar un complejo; y d) poner en contacto el complejo obtenido en la etapa c) con un agente para detectar si el subconjunto comprende los anticuerpos que tienen especificidad de unión para el agente, mediante lo cual se puede seleccionar el conjunto de anticuerpos.

[0015] La presente invención se describe en detalle en las siguientes secciones. Otras características, objetivos y ventajas de la presente invención se pueden encontrar fácilmente en la descripción detallada y las reivindicaciones.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### [0016]

La Figura 1 es una ilustración esquemática de adsorción de LPPC (complejo de liposoma/PEI/PEG) con células de cáncer que reconocen anticuerpos. Los anticuerpos se mezclaron con LPPC marcados con DiO, seguido de bloqueo con PEG1500. Los complejos de LPPC/anticuerpos bloqueados con PEG se incubaron con células (por ejemplo, A549) y a continuación se analizaron mediante citometría de flujo FACScan para determinar sus eficacias de unión a la superficie celular. La media de fluorescencia de cada muestra se normalizó usando un control positivo (LPPC marcado con 100% DiO en las células) y un control negativo (anticuerpo no unido). La media de fluorescencia de cada muestra se dividió primero por la media de fluorescencia del control positivo. Posteriormente, los valores normalizados se dividieron por la media de fluorescencia del control negativo.

La Figura 2 es una ilustración esquemática del liposoma basado en anticuerpos para la detección de fármacos. Se separaron un total de 450 anticuerpos en 50 conjuntos, y éstos fueron utilizados para formar complejos liposoma-anticuerpo (LPPC/anticuerpo). Para cribar la eficacia de la unión del anticuerpo a la superficie celular, se incubaron 50 complejos LPPC/anticuerpo con diferentes líneas celulares de cáncer a 4°C. Los complejos LPPC/anticuerpo con una alta eficacia de unión a la superficie celular se priorizaron a continuación mediante análisis por citometría de flujo FACScan. A continuación, se utilizaron anticuerpos individuales del conjunto seleccionado, por ejemplo, conjunto 3A, para determinar sus eficacias de unión a la superficie celular mediante incubación con LPPC, seguido por el análisis FACScan. La inmunofluorescencia se usó como un cribado secundario para confirmar la localización subcelular de las dianas seleccionadas.

La Figura 3 muestra el cribado de conjuntos de anticuerpos mediados por liposomas para identificar receptores específicos en diferentes líneas celulares de cáncer. Cincuenta conjuntos de anticuerpos individuales se mezclaron con LPPC marcados con DiO, seguido de incubación con 3 líneas de células diferentes (A549, HT29, y MCF7) y análisis con citometría de flujo FACScan. Cinco conjuntos (conjunto 2G, 2I, 3A, 3B y Y1C) exhibieron una mejor eficacia de unión que los otros conjuntos de anticuerpos ensayados. Estos conjuntos se subdividieron en anticuerpos individuales para probar su eficiencia de unión con LPPC, tal como se muestra en la las figuras 4-7. La

palabra "célula" se refiere a la célula sola sin tinción con DiO. "NC Ab" se refiere a anticuerpo no unido en LPPC.

La figura 4 muestra la comprobación de la localización subcelular de las proteínas priorizadas en el conjunto 3B. (A) Los anticuerpos individuales del conjunto 3B se ensayaron en 3 tipos de células cancerosas utilizando el sistema de complejo LPPC/anticuerpo. Muchos de estos anticuerpos se seleccionaron para su posterior verificación de su localización subcelular mediante inmunofluorescencia. (B) 3B-4 (MAPK8, rojo) se localizó en la membrana plasmática en las células HT29 (línea celular de cáncer de colon), pero no en células A549 (línea celular de adenocarcinoma pulmonar).

La Figura 5 muestra la verificación de la localización subcelular de las proteínas priorizadas en el conjunto 2G. (A) Los anticuerpos individuales del conjunto 2G se ensayaron en 3 tipos de células cancerosas utilizando el sistema de complejo LPPC/anticuerpo. Muchos de estos anticuerpos se seleccionaron para su posterior verificación de su localización subcelular mediante inmunofluorescencia. (B) 2G-4 (Nup98, rojo) se localizó en la membrana plasmática en las células A549. 2G-7 (MAG1A9, rojo) se localizó en la membrana plasmática en las células A549 y HT29.

La Figura 6 muestra la verificación de la localización subcelular de las proteínas priorizadas en el conjunto 2I. (A) Los anticuerpos individuales del conjunto 2I se ensayaron en 3 tipos de células cancerosas utilizando el sistema de complejo LPPC/anticuerpo. Dos de estos anticuerpos (2I-3 y 2I-6) se seleccionaron para su posterior verificación de su localización subcelular mediante inmunofluorescencia. (B) 2I-3 (PIK3R4, rojo) y (C) 2I-6 (NPR2, rojo) se localizaron en la membrana plasmática en las células MCF7.

La Figura 7 muestra la verificación de la localización subcelular de las proteínas priorizadas en el conjunto Y1C. (A) Los anticuerpos individuales del conjunto Y1C se ensayaron en 6 tipos de células diferentes utilizando el sistema de complejo LPPC/anticuerpo. Muchos de estos anticuerpos fueron seleccionados para la verificación de su localización subcelular mediante inmunofluorescencia. (B) Y1C-4 (SPAG5, rojo) se localizó en la membrana plasmática en células Mahlavu (línea celular de carcinoma hepatocelular) y MCF7 (línea celular de cáncer de mama), pero no en células A549 (línea celular de adenocarcinoma de pulmón), hepatocitos y Huh7 (línea celular de carcinoma hepatocelular). (C) Y1C-5 (POLR2A, rojo) se localizó en la membrana plasmática en células A549.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

**[0017]** La presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar un conjunto de anticuerpos que comprende detectar si el conjunto de anticuerpos tiene especificidad de unión a un agente.

**[0018]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "molécula" se refiere a una molécula pequeña o una macromolécula implicadas en una reacción bioquímica. Preferiblemente, la molécula es una macromolécula, tal como una proteína, péptido, nucleótido, oligonucleótido o polinucleótidos. La molécula puede ser natural o artificial. En otro aspecto, la molécula puede estar purificada o mezclada con otros contenidos. En una realización preferida de la invención, el patrón de expresión de la molécula es diferente en una condición normal y en una condición anormal, tal como una enfermedad. En otra realización preferida de la invención, el patrón de expresión de la molécula es diferente en diferentes tipos de células. En aún otra realización preferida de la invención, las moléculas son anticuerpos, antígenos, enzimas, sustratos, ligandos, receptores, proteínas asociadas a la membrana celular o marcadores de superficie celular. En una realización preferida adicional de la invención, las moléculas son anticuerpos.

**[0019]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "un conjunto de moléculas" se refiere a un grupo de moléculas, en el que las moléculas pueden ser iguales o diferentes.

**[0020]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "agente" se refiere a una molécula pequeña o una macromolécula implicadas en una reacción bioquímica. Preferiblemente, el agente es una macromolécula, tal como una proteína, péptido, nucleótido, oligonucleótido o polinucleótidos. El agente puede ser natural o artificial. En otro aspecto, el agente puede estar purificado o mezclado con otros contenidos. Preferiblemente, el agente se encuentra en o sobre una célula. En una realización preferida de la invención, el patrón de expresión del agente es diferente en una condición normal y en una condición anormal, tal como una enfermedad. En otra realización preferida de la invención, el patrón de expresión del agente es diferente en diferentes tipos de células. En aún otra realización preferida de la invención, el agente es un anticuerpo, antígeno, enzima, sustrato, ligando, receptor, proteína asociada a la membrana celular o marcador de superficie celular. En una realización preferida adicional de la invención, el agente es un antígeno.

**[0021]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "especificidad de unión" se refiere a una propiedad que, incluso cuando diferentes moléculas están presentes, sólo las moléculas que tienen la forma específica complementaria al sitio activo son capaces de unirse al sitio activo del agente.

**[0022]** Para una fácil manipulación, el conjunto de anticuerpos se encuentra preferiblemente sobre un vehículo. El modo de localización del conjunto de anticuerpos puede ser la unión de origen natural o artificial del conjunto de anticuerpos al vehículo. Según la presente invención, el vehículo es un liposoma.

**[0023]** La mayoría de los liposomas disponibles en la actualidad se fabrican mediante la conjugación covalente de moléculas de reconocimiento sobre componentes del liposoma, tales como colesterol o cadenas laterales de lípidos modificados con polímeros. La reacción de acoplamiento puede dañar drásticamente la actividad de ciertas

moléculas de reconocimiento (NOBS, L., et al, Current Methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. 93 (8): pág 1980-92 ; Kocbek, P., et al, Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. Journal of Controlled Release, 2007. 120 (1-2): pág 18-26). Una forma de evitar este problema consiste en la adhesión no covalente de moléculas de reconocimiento al liposoma catiónico. Sin embargo, la disociación de moléculas de reconocimiento de los liposomas plantea otro problema para influir en la actividad del liposoma (NOBS, L., et al.). Éste es principalmente debido a la interacción débil entre las moléculas de reconocimiento y liposomas. Recientemente, se ha desarrollado un vector liposomal, LPPC (complejo liposoma/PEI/PEG) que no sólo puede ser convenientemente cargado con fármacos anti-tumorales, sino que también puede adsorber fuertemente anticuerpos específicos de tumores en su superficie, lo que permite que la partícula se dirija a las células cancerosas (Liu, Y.K., et al, A unique and potent protein binding nature of liposome containing polyethyleneimine and polyethylene glycol: a nondisplaceable property. Biotechnology and Bioengineering. 2011. 108 (6): pág. 1318-1327). Además, el LPPC puede aislarse por centrifugación, permitiendo que el complejo LPPC/anticuerpo se purifique fácilmente de los anticuerpos no unidos. El LPPC vacío puede incorporarse fácilmente con colorantes fluorescentes para formar una nanopartícula fluorescente, que ofrece el potencial para el desarrollo de una sonda específica adsorbiendo el LPPC fluorescente anticuerpos específicos.

**[0024]** Como se usa en el presente documento, la célula es preferiblemente una célula normal, una célula de cáncer, una célula madre, o una célula madre de cáncer. La unión específica entre la molécula y el agente se produce preferiblemente en la célula en una condición fisiológica o *in vivo*.

**[0025]** Para una fácil manipulación, el vehículo comprende preferiblemente un marcador detectable. Según los tipos de vehículo y el marcador detectable, las habilidades de los técnicos en este campo permiten elegir la manera adecuada para marcar el vehículo al marcador detectable. En una realización preferida de la invención, el marcador detectable es fluorescente o un isótopo radioactivo.

**[0026]** Con el fin de aplicar el procedimiento, según la invención, en otros aspectos, tales como la administración de fármacos, el vehículo preferiblemente comprende además al menos uno de un fármaco, un fármaco citotóxico, un factor de crecimiento, una citoquina, una vacuna y un oligonucleótido .

**[0027]** Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende además la identificación de las moléculas. Los técnicos expertos en este campo pueden aplicar un análisis químico, físico o biológico adecuado para identificar las moléculas.

**[0028]** Según la presente invención, el procedimiento para seleccionar un conjunto de anticuerpos comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un conjunto de anticuerpos candidatos;
- (b) dividir el conjunto de anticuerpos en múltiples subconjuntos;
- (c) cargar cada uno de los subconjuntos en un liposoma para formar un complejo; y
- (d) poner en contacto el complejo obtenido en (c) y el agente para detectar si el subconjunto comprende los anticuerpos que tienen especificidad de unión para el agente, mediante lo cual se puede seleccionar el conjunto de anticuerpos.

**[0029]** Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos candidatos" se refiere a un grupo de anticuerpos que se sospecha que son los anticuerpos de la invención que se están buscando. El conjunto de anticuerpos candidatos puede ser un extracto natural o una combinación artificial, tal como por ejemplo un grupo de hibridomas que expresa anticuerpos.

**[0030]** La condición de la etapa (d) de contacto es preferiblemente equivalente a una fisiológica. El experto en la técnica en este campo es capaz de elegir una condición adecuada.

**[0031]** En una realización preferida de la invención, el procedimiento comprende además dividir el subconjunto en subconjuntos adicionales después de la etapa (b). Esta etapa y las etapas (b), (c) y (d) pueden llevarse a cabo repetidamente para reducir el número de anticuerpos en el conjunto.

**[0032]** Preferiblemente, la etapa (d) comprende además poner en contacto el complejo obtenido en (c) y una célula para detectar si el complejo se une a la célula, en el que el agente se encuentra en o sobre la célula. Tal como se usa en el presente documento, la célula es preferiblemente una célula normal, una célula de cáncer, una célula madre, o una célula madre de cáncer. La unión específica entre la molécula y el agente se produce preferiblemente en la célula en una condición fisiológica o *in vivo*.

**[0033]** Preferiblemente, la etapa (d) comprende además poner en contacto el complejo obtenido en (c) y una célula para detectar si el complejo mata a la célula, en el que el agente se encuentra en o sobre la célula. Tal como se usa en el presente documento, la célula es preferiblemente una célula de cáncer.

**[0034]** Según la invención, el concepto de conjunto pequeño se proporciona para identificar los "los anticuerpos de grupos mixtos" para revelar nuevos receptores sobreexpresados en células determinadas, por ejemplo, células de

cáncer y células madre. El concepto subyacente es la subdivisión de toda la biblioteca de anticuerpos en conjuntos más pequeños para aumentar sustancialmente la probabilidad de detectar receptores potenciales (marcadores de superficie o proteínas asociadas a la membrana) para un tipo de célula de cáncer determinada. Este procedimiento hace que sea más fácil aislar rápidamente un solo anticuerpo una vez identificado un anticuerpo del grupo de candidatos. Además, a diferencia de otros estudios de proteómica y estudios de cribado basados en microarrays, donde las dianas identificadas a menudo carecen de anticuerpos necesarios para la demostración de su localización en la membrana, nuestro enfoque identifica nuevos receptores de reconocimiento de anticuerpos y puede emplearse inmediatamente en varias aplicaciones.

**[0035]** En el procedimiento mencionado anteriormente, las moléculas pueden ser marcadores biológicos, y los marcadores biológicos pueden ser antígenos específicos de tumores, proteínas asociadas a membrana celulares o marcadores de superficie celular.

**[0036]** Hay muchas aplicaciones potenciales del procedimiento de acuerdo con la invención. En una implementación práctica de la invención, este cribado es la identificación de los receptores relacionados con la enfermedad expresados diferencialmente mediante la comparación de las células normales y enfermas. Conjugando liposomas con uno o múltiples anticuerpos, las células tumorales pueden recibir una dosis alta relativa de los fármacos en comparación con los tejidos normales, proporcionando una estrategia de tratamiento alternativa. El receptor identificado puede utilizarse para la administración de fármacos a través de, por ejemplo, el liposoma.

**[0037]** En una implementación práctica adicional de la invención, la identificación de marcadores de superficie celular específicos se lleva a cabo en otras situaciones. Por ejemplo, este enfoque puede ser usado para identificar marcadores de superficie para la investigación de células madre, por ejemplo, en células madre mesenquimales (MSCs), células madre neurales (NSC), células madre pluripotentes y células madre de cáncer, y para identificar los marcadores de diferenciación específica del tipo de célula. El marcador o marcadores de superficie identificados se pueden usar para identificar y aislar las células (o subpoblaciones) de interés de un conjunto heterogéneo. En otras palabras, los marcadores de superficie celular identificados se pueden utilizar para el análisis y clasificación de células a través de, por ejemplo, citometría de flujo.

**[0038]** En aún otra implementación práctica de la invención, el procedimiento es la rápida caracterización de receptores potenciales (marcadores de superficie o proteínas asociadas a la membrana) a partir de grandes grupos de anticuerpos monoclonales o policlonales, generados a partir de péptidos o de presentación en fagos. En general, hay una falta de procedimientos de análisis sistemático para resolver receptores potenciales a partir de estos inventarios de anticuerpos. Usando el cribado de expresión de anticuerpos basados en conjuntos pequeños, es posible rastrear miles de anticuerpos dentro de un corto período de tiempo.

**[0039]** Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a los expertos en la técnica a obtener una mejor comprensión de la presente invención.

## EJEMPLOS

### *Procedimientos*

#### *Células incubadas con complejos LPPC/anticuerpo*

**[0040]** En este ejemplo, el LPPC (complejo liposoma/PEI/PEG) se marcó con colorante de fluorescencia verde DiO durante 30 minutos. A continuación, se incubaron 20  $\mu\text{g}$  de LPPC marcado con DiO con 1  $\mu\text{g}$  de un conjunto de anticuerpos de 9 anticuerpos durante 30 minutos. A continuación, se bloquearon los complejos LPPC/anticuerpo con PEG1500 durante 30 minutos y se centrifugaron a 5900 xg durante 5 minutos para eliminar el exceso de PEG. Finalmente, los complejos LPPC/anticuerpo bloqueados con PEG se incubaron con  $3 \times 10^5$  células durante 30 minutos para permitir la unión con antígenos en la superficie celular. La eficacia de la unión se midió por citometría de flujo FACScan. La media de fluorescencia de cada muestra se normalizó usando un control positivo (LPPC marcado con 100% DiO en las células) y un control negativo (anticuerpo no unido). La media de fluorescencia de cada muestra se dividió primero por la media de fluorescencia del control positivo. Posteriormente, los valores normalizados se dividieron por la media de fluorescencia del control negativo; el corte fue un cambio de 3 veces para la clasificación como un resultado positivo.

### *Inmunofluorescencia*

**[0041]** Para caracterizar la localización de proteínas seleccionadas, las células se tiñeron con anticuerpo mediante inmunofluorescencia. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con 3,7% de formaldehído en PBS durante 5 minutos a 25°C, seguido de lavado con PBS 3 veces durante 10 minutos. Las células se permeabilizaron durante 5 minutos en PBS que contenía 0,5% de Triton X-100 y se bloquearon en suero de cabra normal al 5% durante 30 minutos. Las células fijadas se sondaron con el anticuerpo primario (por ejemplo, SPAG5) en PBS con suero de cabra normal al 1% a 4°C durante la noche. El ADN se tiñó con 4,6-diamidino-2-

fenilindol (DAPI, 2 µg/ml). Las imágenes inmunofluorescentes de las células se adquirieron utilizando un microscopio confocal de barrido láser Olympus FV1000 LSM Fluoview (Olympus).

## Resultados

5 *Establecimiento de complejos LPPC/anticuerpo para el cribado de nuevos receptores y proteínas asociadas a la membrana*

10 **[0042]** El complejo LPPC/anticuerpo se purifica fácilmente de los anticuerpos no unidos. Además, los LPPC vacíos se pueden incorporar fácilmente con colorantes fluorescentes para formar nanopartículas fluorescentes, que ofrecen el potencial para el desarrollo de sondas específicas, adsorbiendo el LPPC anticuerpos específicos. El complejo anticuerpo/LPPC fluorescente sirve como una herramienta muy útil para la detección de antígenos de superficie sin conjugación química. La eficacia de la unión se puede medir mediante un citómetro de flujo FACScan (Figura 1). Estos procesos se pueden realizar de manera fácil y terminar en un pequeño tubo de ensayo, y los resultados demuestran que nuestro enfoque es factible para la identificación de nuevos receptores y/o proteínas asociadas a la membrana.

20 *Cribado de la expresión de anticuerpos en un conjunto pequeño para la identificación de receptores específicos de cáncer y/o proteínas asociadas a la membrana.*

25 **[0043]** La cuestión que queremos abordar es si podemos identificar receptores (marcadores de superficie o proteínas asociadas a la membrana) a través del cribado de anticuerpos. Para demostrar la viabilidad de esta idea, se recogieron primero 450 anticuerpos para este estudio. A continuación, 9 anticuerpos por grupo se seleccionaron al azar y se mezclaron juntos antes de cargar los LPPC fluorescentes. Un total de 50 conjuntos de LPPC-anticuerpos se incubaron inicialmente con 3 líneas celulares diferentes: células de cáncer de pulmón (A549), cáncer de colon (HT29) y cáncer de mama (MCF7). Los complejos anticuerpo-LPPC se sometieron a continuación a análisis FACScan (Figura 2). Basándose en los resultados del cribado primario, muchos conjuntos, incluyendo 3A, 3B, Y1C, 2I y 2G, revelaron mayores capacidades de unión a la membrana en las células de cáncer probadas que los otros conjuntos analizados (Figura 3). Al examinar cuidadosamente la localización subcelular de cada anticuerpo a partir de estos 5 conjuntos seleccionados a través de GO (componente celular) y búsquedas en PubMed, se encontró que cada uno de estos 5 conjuntos seleccionados contenía proteínas de membrana conocidas, que, por supuesto, tienen mejores eficiencias de unión a la membrana. Sin embargo, el conjunto 2I parecía tener diferentes eficacias de unión entre las líneas celulares ensayadas (por ejemplo, la eficacia de unión fue mayor en las células HT29 que en las células A549 y MCF7). Se planteó la posibilidad de que diferentes anticuerpos pueden haber reconocido distintas localizaciones de proteínas ensayadas en diferentes células. Por lo tanto, postulamos que podemos ser capaces de identificar nuevos receptores y/o proteínas asociadas a la membrana a partir de estos 5 conjuntos seleccionados, que fueron seleccionados para estudios adicionales, utilizando anticuerpos individuales de cada grupo (**Figuras 4-7**). Así, después de la primera ronda de cribado, se ensayaron 9 anticuerpos individuales de un grupo positivo (por ejemplo, 3A) para determinar qué anticuerpos son receptores potenciales (o proteínas asociadas a la membrana) para las células cancerosas mediante su carga de nuevo en LPPC fluorescentes (**Figura 2**). Varios anticuerpos de estos 5 conjuntos, por ejemplo, 3A-9 (o PDGFRB) y Y1C-4 (o SPAG5) (**Tabla 1**), no sólo se recuperaron receptores bien conocidos, sino también demostraron la posibilidad de identificar potenciales proteínas asociadas a la membrana en células de cáncer.

45 *Caracterización de la localización subcelular de proteínas priorizadas del cribado de un conjunto pequeño*

50 **[0044]** Se redescubrieron varios receptores conocidos en este cribado, por ejemplo, 3A-9 (o PDGFRB, véase la **Tabla 1**) y 3B-7 (o KRAS2, véase la **Tabla 1**). Además, muchos anticuerpos parecían tener afinidades distintas hacia diferentes líneas celulares. Por ejemplo, Y1C-5 tenía mayor afinidad a las células A549 y HT29 que a las células MCF7, mientras que Y1C-4 tenía mayor afinidad a las células MCF7 que a células A549 y HT29. A fin de validar estas observaciones, hemos creado un cribado de inmunofluorescencia secundario para confirmar la localización en la membrana de las proteínas priorizadas identificadas a partir del cribado inicial del LPPC. Para ampliar la aplicación de este enfoque, se caracterizó la localización subcelular de dianas seleccionadas no sólo en las células iniciales analizadas de cáncer de pulmón (A549), cáncer de colon (HT29) y cáncer de mama (MCF7), sino también se extendió el estudio en otras líneas de células de cáncer, incluyendo células de carcinoma hepatocelular (Mahlavu). Los resultados mostraron que 3B-4 (**Figura 4**), 2G-4 y 2G-7 (**Figura 5**), 2I-3 y 2I-6 (**Figura 6**), y Y1C-4 e Y1C-5 (**Figura 7**) se localizaban en la membrana plasmática con especificidad de tipo celular. Por ejemplo, Y1C-4 (o SPAG5, véase la Tabla 1) fue localizado en la membrana plasmática en células de carcinoma hepatocelular (Mahlavu) pero no en células de cáncer de pulmón (A549, **Figura 7**). SPAG5, una proteína asociada al huso mitótico, es conocida por regular la alineación correcta de los cromosomas durante la metafase, y su expresión está implicada en el cáncer de mama y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Además, el agotamiento de SPAG5 causó la pérdida de la cohesión de cromátidas hermanas. En general, la expresión de SPAG5 fue muy baja durante la interfase y estaba regulada por crecimiento y localizada en los cinetocoros y polos del huso en la metafase. Se necesitan más estudios para diseccionar la vía de señalización mediada por SPAG5 en la membrana celular en el

65 **cáncer de hígado.** Un resumen de los resultados de inmunofluorescencia se muestran en la Tabla 1.

ES 2 621 844 T3

Tabla 1: Verificación de la localización subcelular del anticuerpo con prioridad a través de inmunofluorescencia (IF).

Anticuerpo	Nombre	Localización conocida	Localización ensayada en A549	Localización ensayada en MCF7	Localización ensayada en HT29	Nota
3A-6	BUB1B	núcleo, citosol	citosol	citosol	citosol, membrana plasmática	
3A-9	PDGFRB	membrana plasmática	membrana plasmática	membrana plasmática	membrana plasmática	control positivo
3B-4	MAPK8	núcleo, citosol	citosol	citosol	citosol, membrana plasmática	
3B-6	PRKCA	citosol, membrana plasmática	citosol	citosol	citosol	
3B-7	KRAS2	membrana plasmática, mitocondria	citosol	citosol	citosol, membrana plasmática	control positivo
Y1C-4	SPAG5	núcleo, citosol	núcleo	núcleo, membrana plasmática	núcleo	
Y1C-5	POLR2A	núcleo, nucleoplasma	citosol, membrana plasmática	ND	ND	
Y1C-6	MAD2L1	núcleo, citosol	núcleo, citosol	ND	ND	
2G-3	IQGAP1	núcleo, citosol, membrana plasmática	citosol	citosol	expresión baja	
2G-4	NUP98	núcleo, nucleoplasma	citosol, membrana plasmática	citosol	expresión baja	
2G-7	MAG1A9	desconocido	citosol, membrana plasmática	citosol	citosol, membrana plasmática	
2I-3	PIK3R4	citosol	citosol	citosol	citosol, membrana plasmática	
2I-6	NPR2	membrana plasmática	núcleo, citosol	núcleo, citosol	núcleo, citosol, membrana plasmática	
ND: no determinado						

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la selección de un conjunto de moléculas, cuyo procedimiento comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar un conjunto de anticuerpos;  
(b) dividir el conjunto de anticuerpos en múltiples subconjuntos;  
(c) cargar cada uno de los subconjuntos en un liposoma para formar un complejo; y  
(d) poner en contacto el complejo obtenido en la etapa (c) con un agente para detectar si el subconjunto comprende los anticuerpos que tienen especificidad de unión para el agente, mediante lo cual se puede seleccionar el conjunto de anticuerpos.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales.
- 15 3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente se localiza en o sobre la célula.
- 20 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la célula es una célula normal, una célula de cáncer, una célula madre o una célula madre de cáncer.
- 25 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente es un anticuerpo, antígeno, enzima, sustrato, ligando, receptor, proteína asociada a la membrana celular o marcador de superficie celular.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el liposoma comprende un marcador detectable, y en el que el marcador detectable preferiblemente es fluorescente o un isótopo radioactivo.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el liposoma comprende además un fármaco, un fármaco citotóxico, un factor de crecimiento, una citoquina, una vacuna y/o un oligonucleótido.
- 30 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además identificar los anticuerpos.
- 35 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además dividir un subconjunto de los múltiples subconjuntos obtenidos en la etapa (b) en subconjuntos adicionales, en el que la etapa de dividir el subconjunto de los múltiples subconjuntos obtenidos en la etapa (b) en subconjuntos adicionales y las etapas (b), (c) y (d) se realizan repetidamente para reducir el número de anticuerpos en el conjunto.
- 40 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (d) comprende además poner en contacto el complejo obtenido en (c) y una célula para detectar si el complejo se une a la célula o mata la célula, en el que el agente se localiza en o sobre la célula.

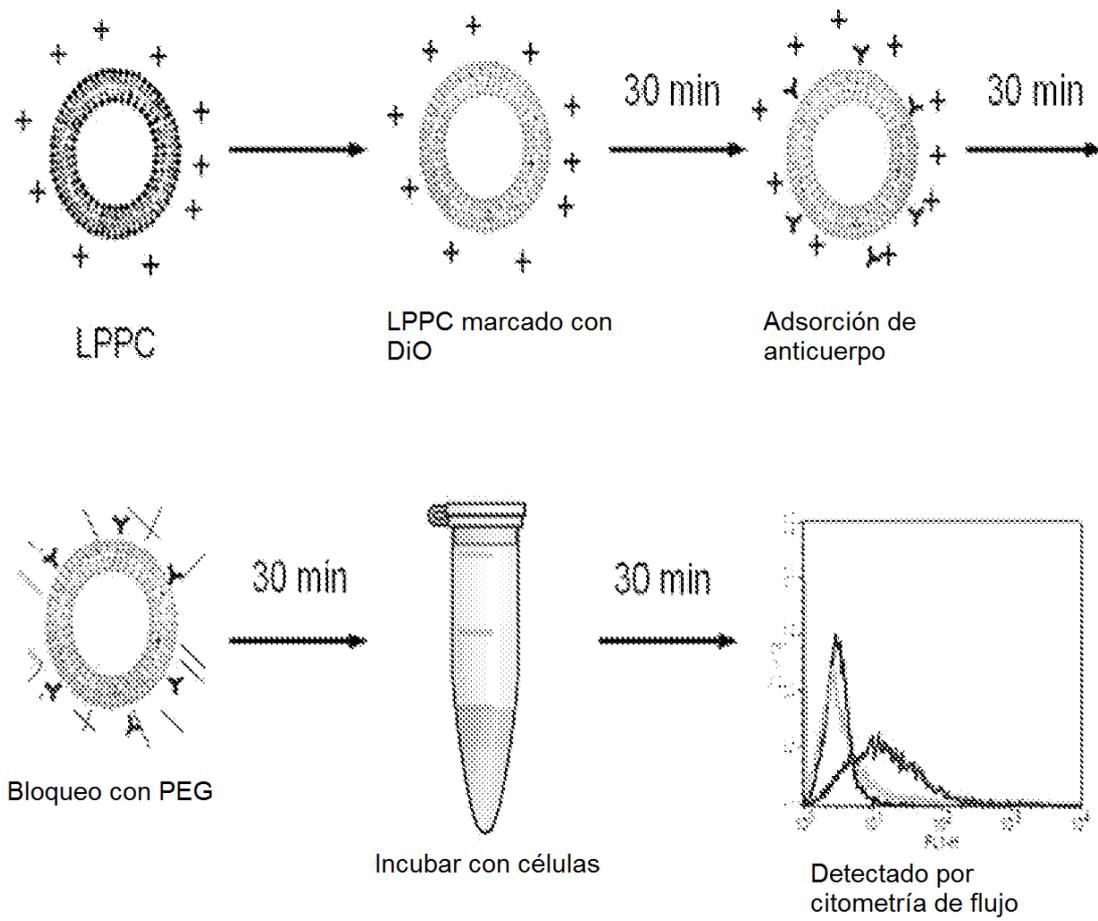


Figura 1

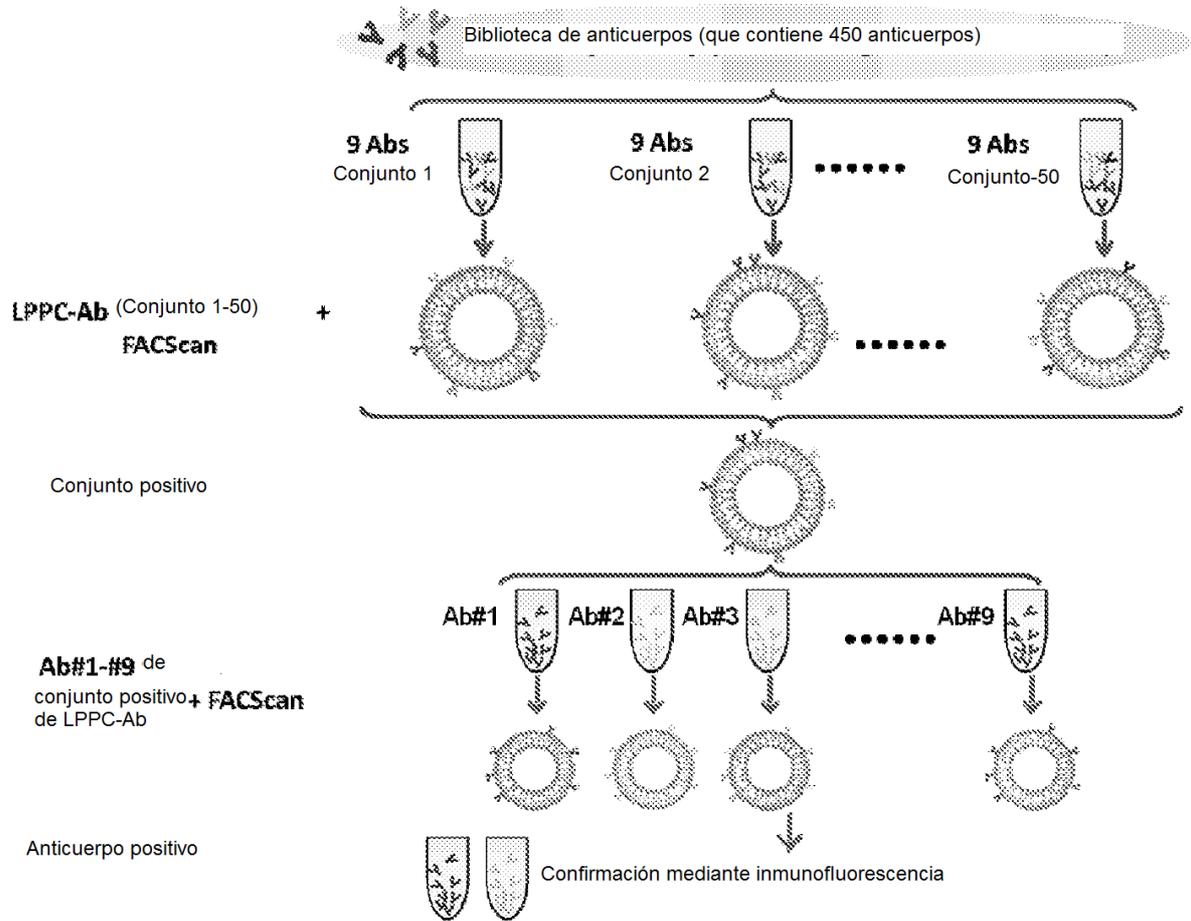
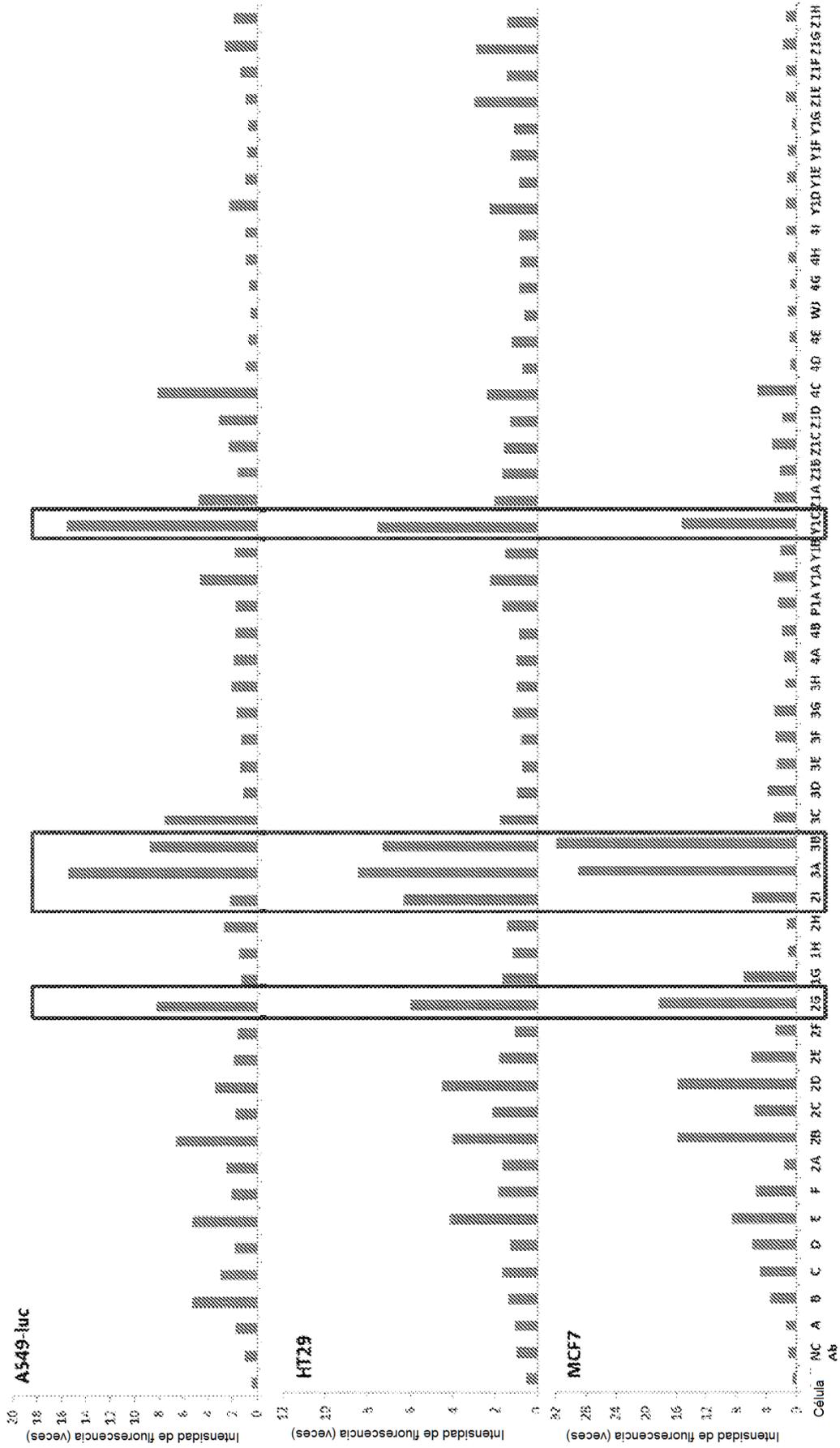


Figura 2



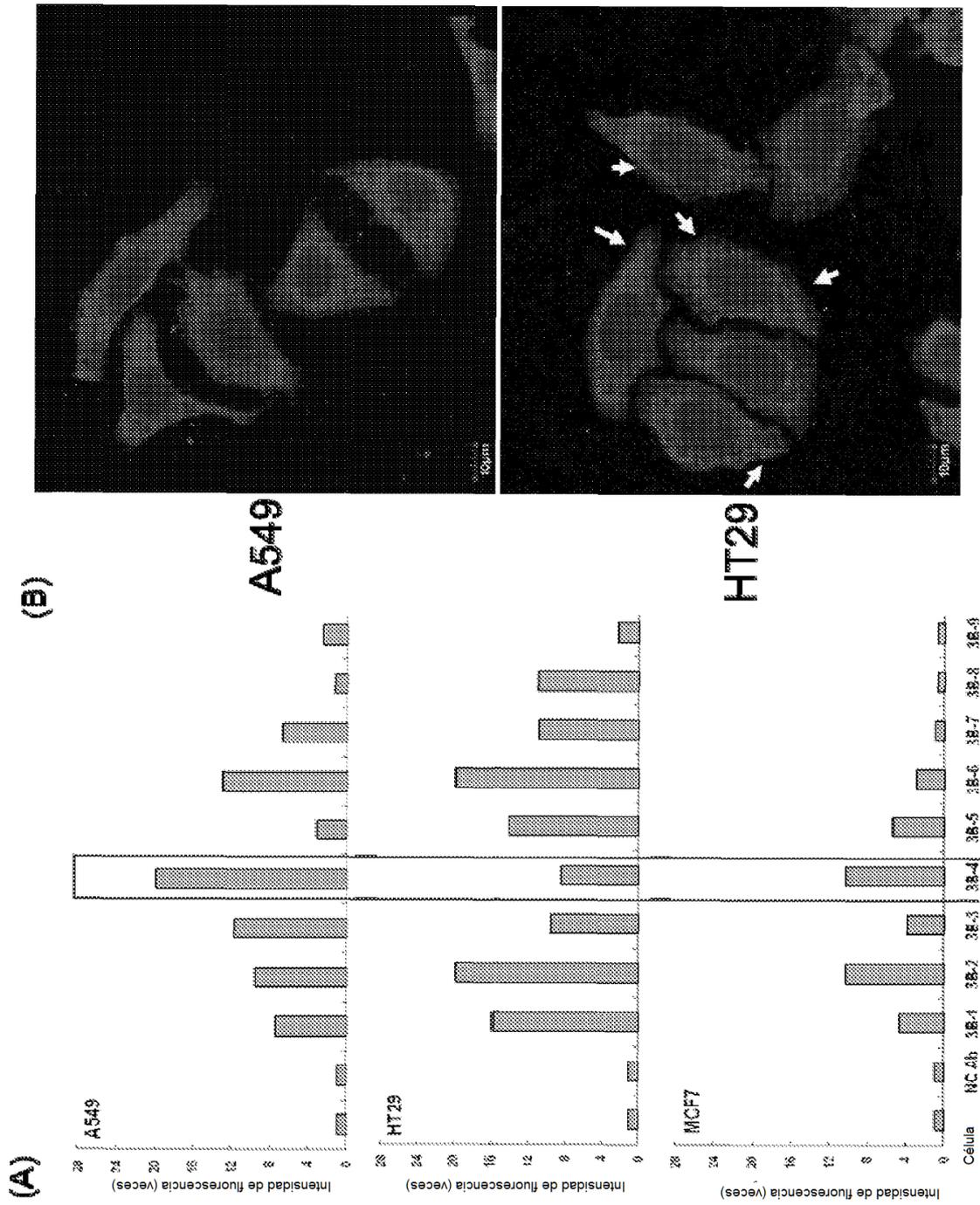


Figura 4

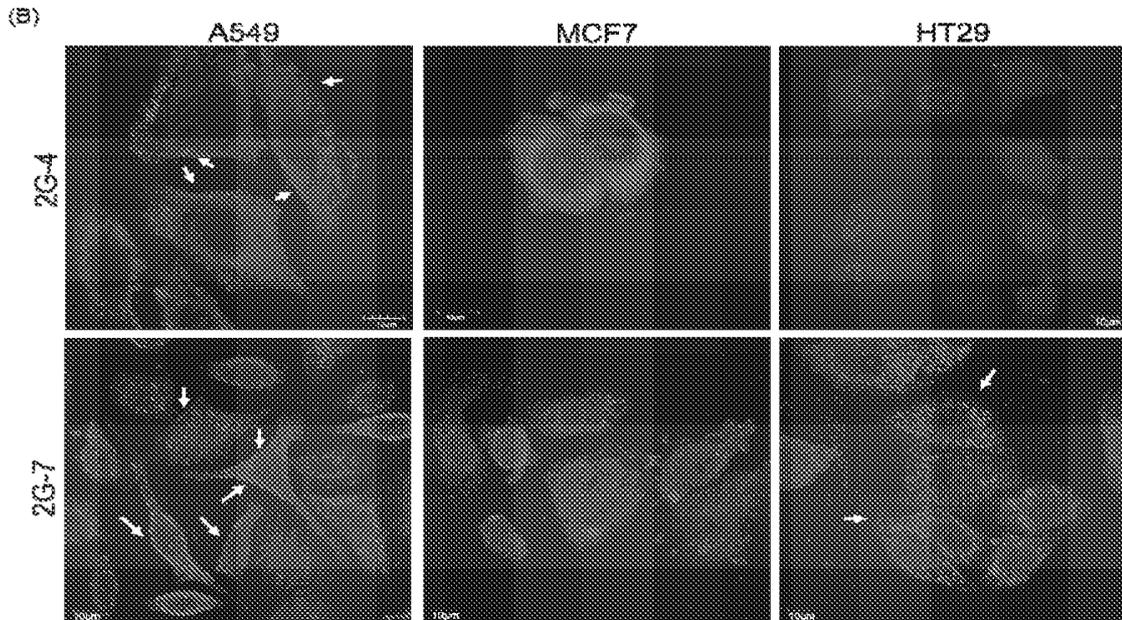
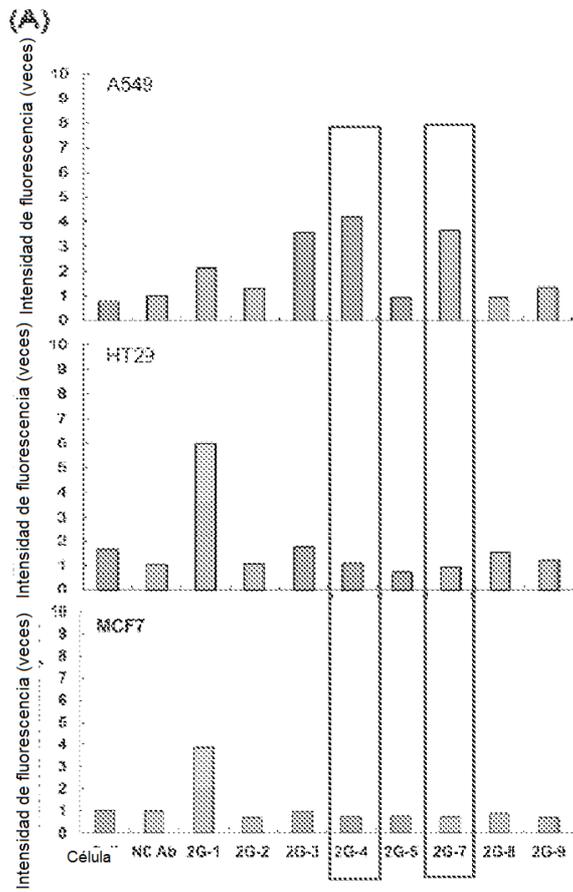


Figura 5

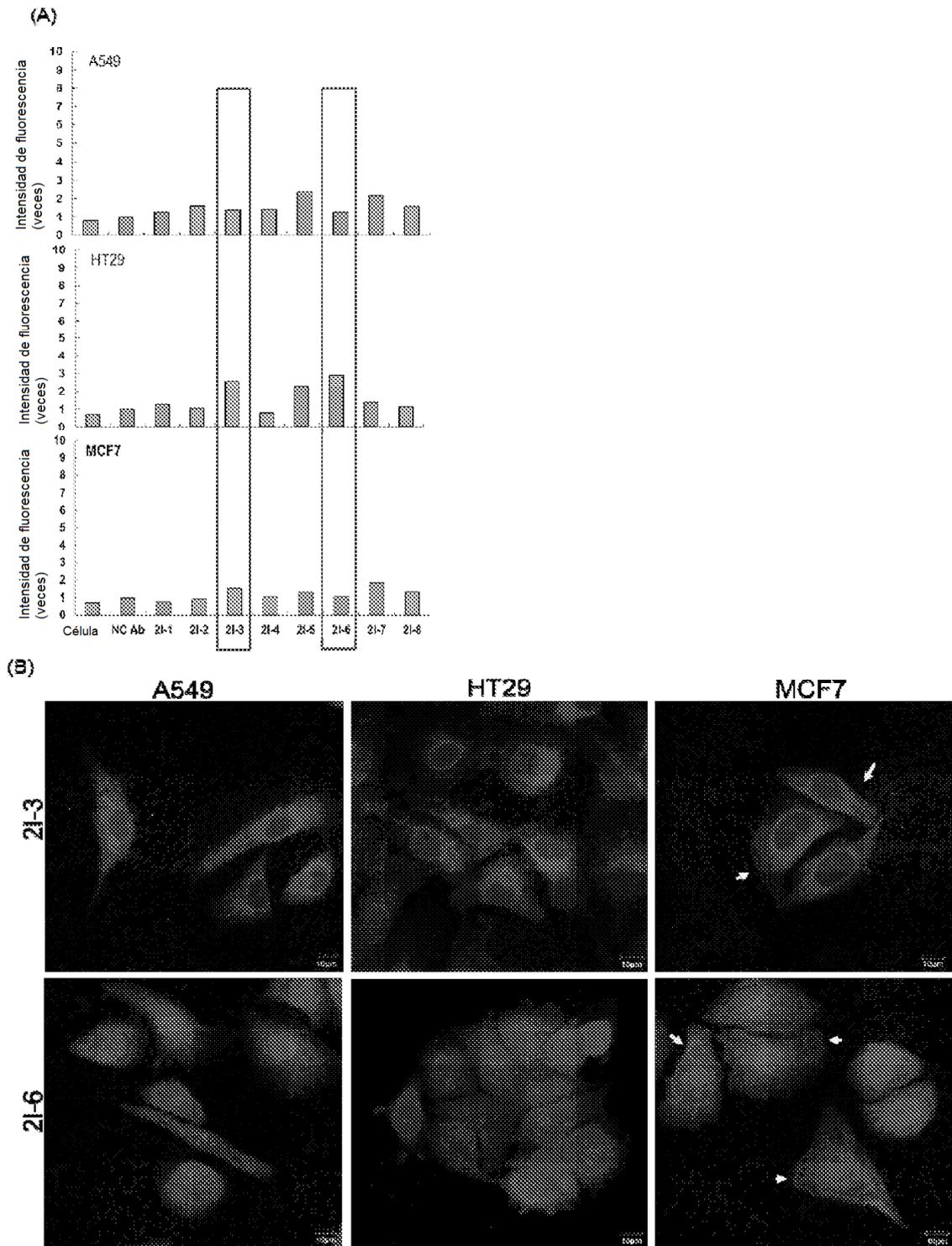


Figura 6

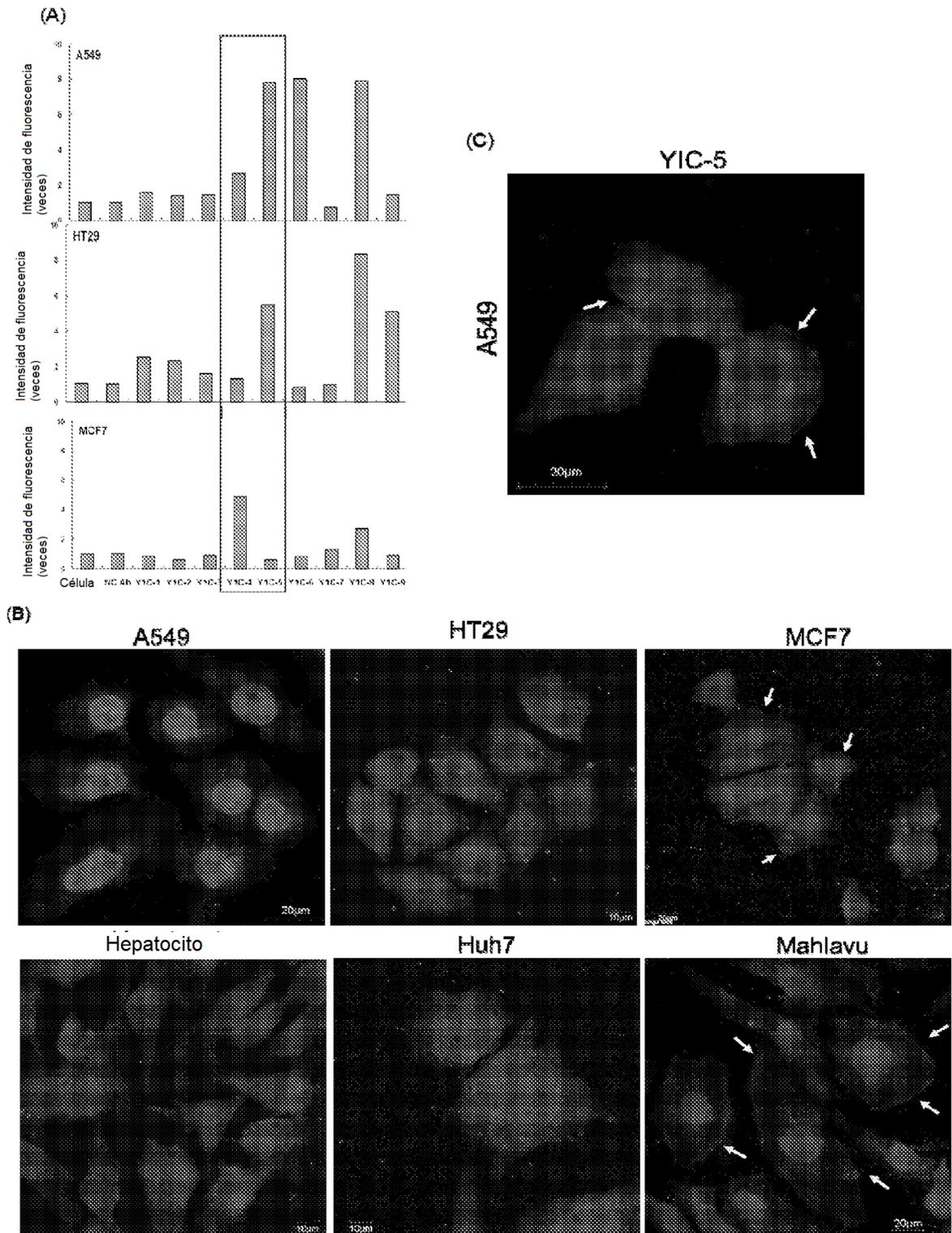


Figura 7