

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 750**

51 Int. Cl.:

C07K 14/36 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2012 PCT/EP2012/063969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2012 E 12747985 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2734538**

54 Título: **Método de tinción reversible de una célula diana**

30 Prioridad:

18.07.2011 US 201161508943 P

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

21.09.2018

73 Titular/es:

**IBA GMBH (100.0%)
Rudolf-Wissell-Strasse 28
37079 Göttingen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMIDT, THOMAS;
STEMBERGER, CHRISTIAN;
BUSCH, DIRK, H. y
GERMEROOTH, LOTHAR**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 682 750 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 tinción reversible de una célula diana

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de tinción reversible de una célula diana. La invención también se refiere a métodos de aislamiento de una célula diana o una población de células diana que se definen por la presencia de al menos una molécula de receptor específico común. La invención también proporciona kits que se pueden usar para llevar a cabo los métodos de la invención.

10 **Antecedentes de la invención**

La terapia celular ha demostrado ser altamente eficaz para el tratamiento de varias enfermedades. Por ejemplo, se pueden curar inmunodeficiencias primarias por trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) y se puede llevar alguna leucemia a remisión completa por HSCT alógeno e infusión de linfocitos de donante (DLI) combinado (Kolb, H.J. et al., Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76 (12), 2462-2465 (1990)). En alguna práctica clínica, la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de virus es muy eficaz para reconstituir pacientes inmunodeprimidos contra complicaciones potencialmente mortales producidas por la reactivación de citomegalovirus (CMV) (Riddell, S.R. et al., Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257 (5067), 238-241 (1992)), o enfermedades linfoproliferativas mediadas por el virus de Epstein-Barr (VEB) (Rooney, C.M. et al., Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345 (8941), 9-13 (1995)). Similarmente, linfocitos T dirigidos a antígeno de tumor, ya sea derivados de linfocitos autólogos infiltrantes de tumor o cultivados o manipulados *in vitro*, son candidatos prometedores para terapias mejoradas.

Independientemente de estas interesantes observaciones clínicas, se espera todavía una transferencia más ancha de la terapia celular a aplicaciones clínicas. Esto es principalmente debido al hecho de que la mayoría de los procedimientos usados para generar preparaciones de células para inmunoterapia son muy laboriosos, requieren mucho tiempo y son caros. Además, normalmente se necesita enriquecer a altas purezas las poblaciones de células que se sabe que median en los efectos clínicos, puesto que células 'no deseadas' contaminantes pueden mediar en efectos secundarios peligrosos y algunas veces potencialmente mortales (como linfocitos T alorreactivos que median en enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) tras el trasplante alógeno de células madre y/o tratamiento con DLI). Como se ha mostrado que números ya muy bajos de linfocitos T adoptivamente transferidos pueden contribuir a los beneficiosos efectos clínicos, también se aplicarán reglas similares para poblaciones de células que median en efectos secundarios negativos. Por tanto, el proporcionar altas purezas de preparaciones de células bien definidas aplicables para terapia llegará a ser clave para hacer estas prometedoras terapias más eficaces y predecibles, además de para reducir el riesgo de posibles efectos secundarios.

Los actuales métodos para la purificación de células clínicas mediada por marcador superficial normalmente se basan en parámetros individuales (por ejemplo, CD34, multímeros de MHC). Sin embargo, para la mayoría de las poblaciones de células - ya sea directamente derivadas *ex vivo* o después de cultivo celular *in vitro* - es necesaria una combinación de diferentes marcadores superficiales con el fin de segregar realmente estas células de otras. Por ejemplo, los linfocitos T reguladores (Tregs) que existen de forma natural representan un prometedor subconjunto de células, que podría ser capaz de prevenir GvHD aguda tras HSCT 4 alógeno o el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias (Riley, J.L., June, C.H., & Blazar, B.R., Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30 (5), 656-665 (2009), Randolph, D.A. & Fathman, C.G., Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med* 57, 381-402 (2006)).

Además de la expresión de CD4, que se comparte por un gran número de células, se necesitan marcadores adicionales como su expresión constitutiva de la cadena α del receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25) para reducir más la heterogeneidad. Sin embargo, CD25 también se expresa en una gran fracción de linfocitos no reguladores, que incluyen linfocitos T efectores y de memoria recientemente activados. Por tanto, se han sugerido patrones de tinción combinatoria, como combinaciones de CD4, CD25, CD127 y CD45RA (Miyara, M. et al., Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30 (6), 899-911 (2009), Hoffmann, P. et al., Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon *in vitro* expansion. *Blood* 108 (13), 4260-4267 (2006)) para identificar con más precisión este subconjunto de linfocitos T clínicamente relevante.

Todas las técnicas de separación de células basadas en marcadores clínicos actualmente disponibles utilizan perlas paramagnéticas, que retienen las poblaciones de células marcadas dentro de un campo magnético. Así, estrategias de enriquecimiento positivo que usan poblaciones diana directamente marcadas dan las purezas más altas. Sin embargo, todavía son difíciles de lograr combinaciones de purificaciones mediante varios marcadores diferentes, aunque son necesarias para aislar distintas poblaciones de células de la pureza más alta. Además, después de la selección positiva, tanto las marcas como las perlas normalmente quedan sobre el producto celular, manipulando

posiblemente la población de células aisladas o afectando negativamente su funcionalidad/viabilidad, por ejemplo, por el bloqueo de receptores. Especialmente con respecto a la clasificación de células clínicas, las restantes marcas de células producen sustanciales cargas reguladoras para la aplicabilidad de los productos de células en pacientes. Con el fin de evitar los problemas de selección positiva, se han cambiado muchos procedimientos de procesamiento de células clínicas a contextos de agotamiento. Desafortunadamente, las purezas de las células diana son frecuentemente malas y los métodos de agotamiento frecuentemente requieren una mezcla complicada de diferentes anticuerpos, que hace que su producción y aplicación sea laboriosa y cara. Un enfoque para el aislamiento funcional de células tales como linfocitos T específicos de antígeno se describe en la solicitud de patente internacional WO 02/054065, la patente de EE.UU. 5.985.658 y por Knabel et al., Nature Medicine, 2002, 8(6):631-637. En estas publicaciones se desvela un método para la tinción reversible y el aislamiento funcional o caracterización de tales células, también denominada tecnología "Streptamer®". La metodología descrita en el documento WO 02/054065, la patente de EE.UU. 5.985.658 y Knabel et al. se ha usado por Schmitt et al., Transfusion, 2010, 51(3):591-599 al nivel de buenas prácticas de fabricación (GMP) para la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de CMV en pacientes con leucemia aguda con antigenemia de CMV recurrente alta después del trasplante alógeno de células madre. Schroeder, Nach Zellen angeln, Faszination Forschung, 30 de junio de 2010, páginas 28-37, Odendahl et al., Vox Sanguinis, 2010, 99(Suppl.1):491-491, Casalegno-Garduno et al., Cancer Immunology immunotherapy, 2009, 59(2):195-202, Neudorfer et al., Journal of Immunological Methods, 2007, 320(1-2):119-131, Bouquié et al., Cancer Immunology immunotherapy, 2009, 58:553-566 describen aplicaciones prácticas adicionales de esta metodología. Además, Matsui et al., PNAS, 1994, 91:12862-12866 D3 desvela las constantes de velocidad de disociación del complejo de TCR con péptido de citocromo c soluble/I-E^K.

Así, todavía existe la necesidad de proporcionar un método para la purificación o aislamiento de células que permita, por ejemplo después de la clasificación de las células, la liberación y eliminación completa de todos los componentes de los reactivos de unión a receptor y de tinción de la población de células purificadas.

Sumario de la invención

En un aspecto la invención proporciona un método *in vitro* de tinción reversible de una célula diana, comprendiendo dicha célula diana una molécula de receptor sobre la superficie de la misma, con una marca detectable, comprendiendo el método:

poner en contacto una mezcla de células que comprende dicha célula diana con

- (i) un reactivo de unión a receptor, comprendiendo el reactivo de unión a receptor al menos un (cualquier) sitio de unión B, en el que el sitio de unión B se une específicamente a dicha molécula de receptor, en el que la constante de la velocidad de disociación (K_{dis}) como se ha determinado por resonancia de plasmones superficiales para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor mediante el sitio de unión B y dicha molécula de receptor tiene un valor de $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, comprendiendo el reactivo de unión a receptor además al menos un componente de unión C, en el que el componente de unión C es capaz de ser unido (reversiblemente) a un sitio de unión Z de un reactivo de multimerización,
- (ii) un reactivo de multimerización, comprendiendo el reactivo de multimerización al menos dos sitios de unión Z para la unión reversible del componente de unión C del reactivo de unión a receptor, en el que el reactivo de unión a receptor (i) y el reactivo de multimerización (ii) forman (una pluralidad de) complejos de unión multivalentes que se unen a dicha célula diana, comprendiendo cada complejo de unión multivalente al menos dos de dichos reactivos de unión a receptor unidos a uno de dicho reactivo de multimerización, proporcionando dicho complejo de unión multivalente elevada avidéz, con respecto a dicho reactivo de unión a receptor; y
- (iii) dicha marca detectable unida a dicho complejo de unión multivalente,

en el que dicha célula diana se tiñe uniendo dicho complejo de unión multivalente a dicha célula diana, y en el que la tinción de dicha célula diana es reversible tras la rotura de la unión entre dicho componente de unión C de dicho reactivo de unión a receptor y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización, en el que dicho reactivo de unión a receptor que se une específicamente a dicha molécula de receptor se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo divalente, un fragmento de anticuerpo monovalente, una molécula de unión proteínica con propiedades de unión de tipo anticuerpo y una molécula de MHC, en el que dicha célula diana es una célula de mamífero.

En el presente documento también se desvela el uso de tal método de tinción para el aislamiento de una población de células diana que se define por la presencia de una molécula de receptor (al menos una específica común).

En el presente documento también se desvela un kit para la tinción reversible de una célula diana (o aislamiento de una célula diana), comprendiendo dicha célula diana una molécula de receptor sobre su superficie, con una marca detectable. Un kit tal comprende:

- (i) al menos un reactivo de unión a receptor que comprende un (cualquier) sitio de unión B que se une específicamente a dicha molécula de receptor, en el que la constante de la velocidad de disociación (K_{dis})

para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor mediante el sitio de unión B y dicha molécula de receptor de unión tiene un valor de aproximadamente $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, y comprendiendo el reactivo de unión a receptor además al menos un componente de unión C, en el que el componente de unión C es capaz de ser (reversiblemente) unido por un sitio de unión Z de un agente de multimerización,

(ii) al menos un reactivo de multimerización que comprende al menos dos sitios de unión Z para dicho componente de unión C del reactivo de unión a receptor, en el que el componente de unión C y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización son capaces de formar un enlace reversible,

(iii) una marca detectable unida o capaz de unirse al reactivo de unión a receptor (i) y/o el reactivo de multimerización (ii).

En el presente documento también se desvela el uso de un reactivo de unión a receptor que se une específicamente a una molécula de receptor, comprendiendo el reactivo de unión a receptor al menos un sitio de unión B, en el que el sitio de unión B se une específicamente a dicha molécula de receptor, en el que la constante de la velocidad de disociación (k_{dis}) para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor mediante el sitio de unión B y dicha molécula de receptor tiene un valor de aproximadamente $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, para un método de tinción reversible de una célula diana.

En el presente documento también se desvela un método de tinción reversible de una célula diana, comprendiendo dicha célula diana una (al menos una) molécula de receptor sobre la superficie de la misma, con una marca detectable, comprendiendo el método:

poner en contacto una mezcla de células que comprende dicha célula diana con

(i) al menos dos tipos de un reactivo de unión a receptor, comprendiendo cada tipo de reactivo de unión a receptor al menos un sitio de unión B, en el que el sitio de unión B de cada tipo de reactivo de unión a receptor se une específicamente a dicha molécula de receptor, en el que la constante de la velocidad de disociación (k_{dis}) para la unión entre cada tipo de dicho reactivo de unión a receptor mediante el sitio de unión B y dicha molécula de receptor tiene un valor de aproximadamente $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, comprendiendo cada tipo de reactivo de unión a receptor además al menos un componente de unión C, en el que el componente de unión C de cada tipo de reactivo de unión a receptor es capaz de ser reversiblemente unido a un sitio de unión Z de un reactivo de multimerización,

(ii) un reactivo de multimerización, comprendiendo el reactivo de multimerización al menos un sitio de unión Z para la unión reversible del componente de unión C de cada tipo del reactivo de unión a receptor, en el que los al menos dos tipos de reactivo de unión a receptor (i) y el reactivo de multimerización (ii) forman (una pluralidad de) complejos de unión multivalentes que se unen a dicha célula diana, comprendiendo cada complejo de unión multivalente al menos uno de cada tipo de reactivo de unión a receptor unido a uno de dicho reactivo de multimerización, proporcionando dicho complejo de unión multivalente elevada avidéz, con respecto a cada tipo de dicho reactivo de unión a receptor; y

(iii) dicha marca detectable unida a dicho complejo de unión multivalente,

en el que dicha célula diana se tiñe uniendo dicho complejo de unión multivalente a dicha célula diana, y en el que la tinción de dicha célula diana es reversible tras la rotura de la unión entre dicho componente de unión C de cada tipo de dicho reactivo de unión a receptor y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización.

En el presente documento también se desvela un kit de reactivos para la tinción reversible (o aislamiento) de una célula diana, comprendiendo dicha célula diana una molécula de receptor sobre la superficie de la misma, con una marca detectable, comprendiendo el kit:

(i) al menos dos tipos de un reactivo de unión a receptor que comprenden un sitio de unión B que se une específicamente a dicha molécula de receptor, en el que la constante de la velocidad de disociación (k_{dis}) para la unión entre cada tipo de dicho reactivo de unión a receptor mediante el sitio de unión B y dicha molécula de receptor de unión tiene un valor de aproximadamente $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, y comprendiendo cada tipo de reactivo de unión a receptor además al menos un componente de unión C, en el que el componente de unión C de cada tipo del reactivo de unión a receptor es capaz de ser (reversiblemente) unido por un sitio de unión Z de un reactivo de multimerización,

(ii) al menos un reactivo de multimerización que comprende al menos un sitio de unión Z para dicho componente de unión C de cada tipo del reactivo de unión a receptor, en el que el componente de unión C de cada tipo de reactivo de unión y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización son capaces de formar un enlace reversible,

(iii) una marca detectable unida o capaz de unirse al reactivo de unión a receptor (i) y/o el reactivo de multimerización (ii).

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considera conjuntamente con los ejemplos no limitantes y los dibujos adjuntos, en los que:

La **Fig. 1** representa el principio del método de tinción reversible de la invención usando un fragmento Fab como (al menos un) reactivo de unión a receptor (en el caso de un fragmento Fab y también generalmente en una realización de la invención, el reactivo de unión a receptor puede tener un único sitio de unión para la molécula de receptor). La **Fig. 1a** muestra un ejemplo ilustrativo de un fragmento Fab que se usa como reactivo de unión a receptor, en el que un péptido de unión a estreptavidina, *Strep-tag*[®], es el componente de unión C del reactivo de unión a receptor. En esta realización, el péptido de unión a estreptavidina está fusionado o conjugado con el fragmento Fab para formar el reactivo de unión a receptor. En este ejemplo como se muestra en la **Fig. 1a**, el reactivo de multimerización que comprende al menos dos sitios de unión Z para dicho al menos un componente de unión C es una estreptavidina-muteína ("*Strep-Tactin*[®]"). En el ejemplo de la **Fig. 1a**, el reactivo de multimerización lleva una marca fluorescente tal como ficoeritrina. En el ejemplo de la **Fig. 1b**, nuevamente un fragmento Fab se muestra junto con un reactivo de multimerización que está conjugado con una perla magnética que sirve de marca. El método de tinción reversible usando la formación de complejos de unión multivalentes entre la estreptavidina-muteína y un fragmento Fab mediante el péptido de unión a estreptavidina también se denomina en el presente documento "tinción de multímeros de Fab". La **Fig. 1c** representa una visión general esquemática de este método de tinción reversible de multímeros de Fab. En este ejemplo, se tiñen/aíslan células diana de una mezcla de células presentes en una muestra de sangre. Se multimerizan reversiblemente fragmentos Fab con una velocidad k_{dis} de aproximadamente $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor para la unión a una molécula de receptor celular que está presente sobre una célula diana por formación de complejos *Strep-tag*[®]/*Strep-Tactin*[®]. Se tiñen células diana con el complejo de unión multivalente (poniendo en contacto las células con el reactivo de multimerización y el reactivo de unión a receptor como se muestra en la etapa a) de la **Fig. 1c**) y se separan opcionalmente de otras células que carecen de la molécula de receptor de la superficie celular relacionada, por ejemplo, por citometría de flujo activada por fluorescencia (también conocida con la marca registrada "FACS[™]" en la etapa b) de la **Fig. 1c**). El posterior tratamiento de células diana teñidas aisladas con el ligando de *Strep-Tactin*[®] D-biotina que compite con el péptido *Strep-tag*[®] produce el desplazamiento de los fragmentos Fab del reactivo de multimerización, liberando así el reactivo de multimerización (complejo de *Strep-Tactin*[®]) de la célula diana (como se muestra en la etapa c) de la **Fig. 1c**). Los restantes fragmentos Fab, sin complejar de *Strep-Tactin*[®], se disocian (espontáneamente) en una ventana de tiempo razonable debido a su alta velocidad k_{dis} y se pueden eliminar completamente de la superficie de la célula diana lavando (etapa d) de la **Fig. 1c**). El lavado se puede llevar a cabo en un volumen diluyendo los fragmentos Fab durante cada etapa de lavado hasta al menos una concentración igual a la constante de disociación de afinidad (K_d) para la unión entre el fragmento Fab y la molécula de receptor de la superficie celular relacionada. La **Fig. 1d** muestra el procedimiento de tinción análogo al de la **Fig. 1c** en el que el reactivo de multimerización se conjuga con una perla magnética y en el que la etapa de tinción/separación incluye separación de células teñidas de células no teñidas mediante una columna magnética a la que se unen las células teñidas.

La **Fig. 2** muestra las características de unión requeridas para la tinción reversible de multímeros de Fab. La **Fig. 2** muestra un análisis de FACS de tinción de multímeros de Fab anti-CD4 con diferentes mutantes de Fab anti-CD4 con velocidades k_{dis} crecientes para la unión de los fragmentos Fab a CD4 como molécula de receptor (se enumera un resumen de la unión cinética de los fragmentos Fab en la Tabla 1). Se tiñeron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con fragmentos Fab anti-CD4 (reactivo de unión a receptor) fusionados a una disposición secuencial de dos secuencias de *Strep-tag*[®] (comercialmente disponible con el nombre comercial "One-STrEP-tag"; componente de unión C) y multimerizados sobre *Strep-Tactin*[®] marcada con ficoeritrina (*Strep-Tactin* PE; IBA GmbH, Göttingen, Alemania; reactivo de multimerización que comprende al menos 2 sitios de unión Z para el componente de unión C) y se analizaron ya fuera antes (segunda columna) o después del tratamiento con D-biotina (tercera columna). Los restantes monómeros de Fab (es decir, fragmentos Fab usados como reactivo de unión a receptor) sobre la superficie de la célula diana se detectaron entonces después de posteriores etapas de lavado para eliminar los monómeros de Fab usando *Strep-Tactin* PE solo (sin fragmentos Fab unidos) (cuarta columna). Se realizó otra vez la tinción de multímeros de Fab después de la tinción reversible descrita anteriormente de las células (quinta columna) para controlar el final de la eliminación de biotina que de otro modo habría impedido la tinción de los restantes monómeros de Fab con *Strep-Tactin* PE solo (sin fragmentos Fab unidos) como se muestra en la cuarta columna y que así habría inducido una conclusión errónea del experimento. Alternativamente, se incubaron células con fragmentos Fab monoméricos, se lavaron y posteriormente se analizaron después de la tinción con *Strep-Tactin*[®] PE (primera columna, es decir, primera columna a la izquierda). Se muestran linfocitos T CD3⁺ vivos. Los números en los gráficos de puntos indican el porcentaje de células dentro de las puertas.

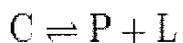
La **Fig. 3** muestra, alternativamente al análisis de FACS de la Figura 2, un análisis de transferencia Western de reversibilidad de la tinción de multímeros de Fab. Se generaron multímeros de Fab de CD4 con los diferentes mutantes de Fab anti-CD4 enumerados en la Tabla 1 y se especificaron además en la Figura 2 y *Strep-Tactin*[®] PE (IBA GmbH, Göttingen, Alemania). Se incubaron CMSP con los diferentes multímeros de Fab de CD4 y se verificó tinción celular coherente en cada muestra por citometría de flujo (línea continua en comparación con el histograma teñido que representa células sin teñir). Entonces, las células se trataron con D-biotina y posteriormente se lavaron. Finalmente, se lisaron las células lavadas, y las fracciones solubles (S) e insolubles (I) se analizaron para los monómeros de Fab restantes usando anticuerpos anti-*Strep-tag*[®] altamente específicos (conjugado *StrepMAB*-peroxidasa de rábano picante (HRP) clásica; IBA GmbH, Göttingen, Alemania). Para controlar la aplicación de cantidades coherentes de material celular insoluble, se detectó simultáneamente β -actina con un anticuerpo primario contra β -actina de conejo (Santa Cruz Biotechnology Inc.,

Santa Cruz, EE.UU.) y un anticuerpo secundario contra Ig de conejo (inmunoglobulina) conjugado con HRP (Sigma, St. Louis, EE.UU.).

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona un método para la tinción reversible de una célula diana o una población de células diana que tiene una molécula de receptor sobre la superficie celular. La invención se basa en el hallazgo de que, a diferencia de los métodos descritos en la patente de EE.UU. 7.776.562 o la solicitud de patente internacional WO02/054065, no es esencial para la reversibilidad de un método tal que se de una unión de baja afinidad entre un reactivo de unión a receptor y una molécula de receptor sobre la superficie de la célula diana. Más bien, se ha encontrado en la actual invención que independientemente de la intensidad de la unión, que significa si la constante de disociación (K_d) para la unión entre el reactivo de unión a receptor y la molécula de receptor es de baja afinidad, por ejemplo, en el intervalo de una K_d de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-7} M, o de alta afinidad, por ejemplo, en el intervalo de una K_d de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 1×10^{-10} M, una célula diana se puede tener reversiblemente en tanto que la disociación de la unión del reactivo de unión a receptor mediante el sitio de unión B y la molécula de receptor se produzca suficientemente rápido. Expresado en términos de la velocidad k_{dis} (también denominada constante de la velocidad de disociación para la unión entre el reactivo de unión a receptor (mediante el sitio de unión B) y la molécula de receptor, la velocidad k_{dis} es aproximadamente $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, aproximadamente $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o mayor, o aproximadamente $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o mayor. El término "aproximadamente", cuando se usa en el presente documento en relación con la velocidad k_{dis} , la velocidad k_{as} o K_d pretende incluir un margen de error de $\pm 0,1 \%$, $\pm 0,2 \%$, $\pm 0,3 \%$, $\pm 0,4 \%$, $\pm 0,5 \%$, $\pm 0,7 \%$, $\pm 0,9 \%$, $\pm 1,0 \%$, $\pm 1,2 \%$, $\pm 1,4 \%$, $\pm 1,6 \%$, $\pm 1,8 \%$, $\pm 2,0 \%$, $\pm 2,2 \%$, $\pm 2,4 \%$, $\pm 2,6 \%$, $\pm 2,8 \%$, $\pm 3,0 \%$, $\pm 3,5 \%$, $\pm 4,0 \%$, $\pm 4,5 \%$, $\pm 5,0 \%$, $\pm 6,0 \%$, $\pm 7,0 \%$, $\pm 8,0 \%$, $\pm 9,0 \%$, $\pm 10,0 \%$, $\pm 15,0 \%$ o $\pm 20,0 \%$.

En este contexto, se observa que la formación del complejo (C) entre un reactivo de unión a receptor L y su receptor P, por ejemplo, un molécula de receptor de la superficie celular se puede describir por un proceso de dos estados indicado



35 La constante de disociación K_d correspondiente se define

$$K_d = \frac{[P][L]}{[C]}$$

40 en la que [P], [L] y [C] son las concentraciones molares en equilibrio del receptor, el reactivo de unión a receptor (ligando) y el complejo respectivo a una temperatura y presión dadas. La constante de disociación K_d también se puede expresar como la relación de la constante de la velocidad de asociación (k_{as}) para la velocidad de asociación/formación (también denominada constante de la velocidad de asociación) del complejo y la constante de la velocidad de disociación (k_{dis}) para la disociación del complejo (también denominada constante de la velocidad de disociación) con

$$45 \quad K_d = k_{dis}/k_{as}$$

En la presente solicitud, los valores de las constantes termodinámicas y cinéticas K_d , K_a , k_{as} y k_{dis} se refieren a su determinación en "condiciones normales", es decir, una temperatura de 25 °C y presión atmosférica de 1,013 bares.

50 En la presente invención, se ha encontrado, como se ha mencionado anteriormente, que la velocidad k_{dis} [s^{-1}] para la unión del reactivo de unión a receptor a la molécula de receptor mediante su sitio de unión específica B es el determinante para la reversibilidad de la tinción de una célula diana por un reactivo de unión a receptor respectivo que tiene un componente de unión C adicional, en la que el componente de unión C es capaz de ser unido por un reactivo de multimerización como se define en el presente documento. El intervalo de k_{dis} se puede elegir dentro de un intervalo, dependiendo, por ejemplo, de la célula diana a teñir y opcionalmente a purificar y la condición experimental respectiva. Teniendo en cuenta que la semivida $T_{1/2}$ del complejo (C) entre el reactivo de unión a receptor L y la molécula de receptor P se puede expresar como $\ln 2/k_{dis} = 0,693/k_{dis}$ con una k_{dis} de $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, se necesitan 13860 segundos o 231 minutos o 3,85 horas para reducir a la mitad la concentración del complejo entre el reactivo de unión a receptor y la molécula de receptor, suponiendo que la dilución es suficiente para despreciar que se vuelva a unir el reactivo de unión a receptor disociado a la molécula de receptor. Para una velocidad k_{dis} de $1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, entonces se necesitan 6390 segundos (o solo 106,5 minutos o 1,775 horas), para una k_{dis} de $2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ se necesitan 3465 segundos (o 57 minutos. es decir, menos de 1 hora) y para una k_{dis} de $4,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ se

necesitan 1732 segundos (o aproximadamente 28 minutos) para lograr la misma reducción en la concentración del complejo. Así, para el lavado que se lleva a cabo después de la separación de las células diana teñidas de las otras células en la muestra y después de la rotura del complejo multivalente formado entre el reactivo de multimerización y el reactivo de unión a receptor, se puede elegir el reactivo de unión a receptor de células dependiendo de la sensibilidad de la célula a teñir a las influencias externas. Por ejemplo, para una célula bastante sensible, se puede usar un reactivo de unión a receptor con una velocidad k_{dis} bastante alta de, por ejemplo, superior a $4,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ de manera que, después de la rotura de los complejos de unión multivalentes, se pueda eliminar la mayoría del reactivo de unión a receptor en el plazo de una hora (como se ilustra anteriormente, en el plazo de 56 minutos la concentración de los complejos se reduce al 25 % de la concentración original, suponiendo que se pueden desprestigiar los efectos de que vuelva a unir debido a dilución suficiente). Para una célula más robusta, se puede usar un reactivo de unión a receptor con una velocidad k_{dis} más baja de, por ejemplo, $1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, cuya disociación necesita, por consiguiente, mucho más tiempo, (en este caso, se necesitan 212 min o aproximadamente 3 horas y media para disociar y eliminar el 75 % del reactivo de unión a molécula de receptor). Después de disociación del reactivo de multimerización (por ejemplo, por medio de un competidor que es capaz de romper el enlace reversible entre el componente de unión C y el reactivo de multimerización), también se puede producir lavado con agitación suave constante durante al menos 2 veces la semividua $T_{1/2}$ en un volumen de tampón que diluye el reactivo de unión a receptor empleado a una concentración que es al menos un factor de 10 por debajo de la constante de disociación (K_d). Entonces se elimina el reactivo de unión a receptor disociado, por ejemplo, mediante sedimentación de las células diana, y desechando el sobrenadante. En una realización alternativa, es posible repetir el lavado anteriormente descrito una vez o dos veces o varias veces para eliminar el reactivo de unión a receptor hasta casi el final. En este contexto, se observa que el término "lavado" como se usa en el presente documento con referencia a las células diana teñidas significa que las células diana teñidas se ponen en contacto (concomitantemente con la rotura de los complejos de unión multivalentes o después de la rotura de los complejos de unión multivalentes) con una cantidad suficiente de tampón de lavado, se incuban con el tampón de lavado durante un periodo de tiempo adecuado para la disociación del reactivo de unión a receptor de la molécula de receptor y entonces se separa del tampón de lavado (que así elimina el reactivo de unión a receptor disociado) por un procedimiento adecuado, por ejemplo, sedimentación de las células diana y eliminación del sobrenadante o, por ejemplo, filtración del tampón de lavado. El lavado se lleva a cabo normalmente en tampón que no tiene un efecto adverso sobre la viabilidad o el estado de las células a teñir o aislar, es decir, el lavado se realiza en condiciones fisiológicamente aceptables (tales como tampón fisiológicamente aceptable, temperatura adecuada, por ejemplo, a 4 °C, 15 °C o 25 °C (es decir, temperatura ambiente) etc.). El experto medio en la materia puede determinar empíricamente fácilmente condiciones de lavado experimentales adecuadas. Por ejemplo, si k_{dis} tiene un valor relativamente alto próximo a $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, y las células teñidas son (relativamente) insensibles a temperatura más alta, el lavado se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, para permitir una disociación más rápida del reactivo de unión a receptor de las células teñidas. Alternativamente, si las células teñidas son relativamente sensibles a temperatura más alta, el lavado se podría llevar a cabo a 4 °C, de manera que la disociación/eliminación del reactivo de unión a receptor necesita más tiempo, sin embargo, no se afectará el estado o viabilidad funcional de las células. En algunas realizaciones se prefiere una temperatura de 4 °C o al menos inferior a 15 °C para prevenir cualquier cambio del estado fisiológico de las células diana.

En este contexto, se observa que el reactivo de unión a receptor pueden o bien tener un (cualquier) single sitio de unión B que se une específicamente a la molécula de receptor o el reactivo de unión a receptor también puede tener dos o más de tales sitios de unión B, en tanto que la unión de la molécula de receptor mediante (cada uno de) el (los) sitios de unión B tenga un valor agregado de la k_{dis} de aproximadamente $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor. Así, el reactivo de unión a receptor puede ser monovalente (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monovalente o una molécula de unión artificial monovalente (proteínica u otra) tal como una muteína basada en un polipéptido de la familia de lipocalina (también conocidos como "Anticalin®"), o una molécula bivalente tal como un anticuerpo o un fragmento en el que se retienen ambos sitios de unión tal como un fragmento $F(ab)_2$. El reactivo de unión a receptor podría incluso ser una molécula IgM pentamérica, siempre que la velocidad k_{dis} de la molécula de IgM completa sea $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor.

Se pueden determinar la velocidad k_{dis} para la unión del reactivo de unión a receptor a la molécula de receptor y, por supuesto, también la velocidad k_{as} mediante métodos convencionales, tales como resonancia de plasmones superficiales (SPR), por ejemplo, usando la tecnología BIAcore (SPR; Jonsson, U. et al. (1991) *Biotechniques*, 11, 620-627). Esta determinación está dentro del conocimiento promedio del experto en la materia. Normalmente, la determinación se lleva a cabo a 25 °C por análisis de resonancia de plasmones superficiales, a una concentración adecuada del reactivo de unión a receptor) siendo la molécula de receptor inmovilizada sobre la superficie de un chip sensor respectivo. El ligando (es decir, el reactivo de unión a receptor), por ejemplo, un fragmento Fab, se aplica sobre el chip en diferentes concentraciones (normalmente alrededor del valor de K_d estimado como se determina a partir de caracterizaciones preliminares), usando caudales en el intervalo de $\mu\text{l}/\text{min}$.

Como un ejemplo ilustrativo, se requiere en este contexto a la determinación de la velocidad k_{dis} de la unión de CD4 (como una molécula de receptor) a fragmentos Fab derivados del anticuerpo monoclonal 13B8.2. Como se describe en la patente de EE.UU. 7.482.000 o en Bes, C., et al., *J Biol Chem* 278, 14265-14273 (2003), la velocidad k_{dis} y los otros parámetros cinéticos se pueden determinar a 25 °C por análisis de resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento BIAcore 2000 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). Puede inmovilizarse covalentemente CD4

recombinante sobre una superficie de chip sensor CM5 usando el método de acoplamiento de amina según las instrucciones del fabricante. Se puede preparar una superficie de referencia de control usando el mismo tratamiento químico del flujo superficie celular sin inyección de CD4. Entonces se pueden inyectar mutantes de Fab recombinantes en tampón que contiene Hepes 10 mM (pH 7,4), EDTA 3 mM, NaCl 150 mM y 0,005 % de tensioactivo no iónico P20 (BIAcore AB) a concentraciones de entre 5 y 20 $\mu\text{g/ml}$ sobre la celda de flujo, y se seguirá la fase de disociación por una etapa de regeneración con disolución 5 mM de HCl. El caudal puede establecerse a 30 $\mu\text{l/min}$. Todos los sensogramas se pueden corregir restando la señal de la superficie de referencia de control. Entonces se pueden ajustar globalmente los datos a una isoterma de Langmuir 1:1 usando el software BIAevaluation Versión 3.2.

Como otro ejemplo ilustrativo, se refiere a la determinación de la velocidad k_{dis} de fragmentos Fab anti-CD30 para el fragmento de antígeno CD30A recombinante como se mide por resonancia de plasmones superficiales por Schlapschy, M., et al. "Functional humanization of an anti-CD30 Fab fragment for the immunotherapy of Hodgkin's lymphoma using an in vitro evolution approach" Protein Eng Des Sel 17, 847-860 (2004). Esta determinación se llevó a cabo en un sistema BIAcore X (BIAcore, Uppsala, Suecia). Después del intercambio de tampón a acetato sódico 10 mM a pH 3,85 por filtración en gel, se diluyó CD30A purificado a 50 $\mu\text{g/ml}$ y se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 de 'calidad para investigación' usando el kit de acoplamiento de amina (BIAcore), dando como resultado la inmovilización de 1700 unidades de respuesta (UR). Los fragmentos Fab recombinantes purificados se aplicaron en PBS/P (PBS que contiene 0,005 % de tensioactivo P-20; BIAcore) en una serie de concentraciones apropiadas. Se observó formación de complejos bajo un flujo de tampón continuo de 5 $\mu\text{l/min}$. Los sensogramas se corrigieron restando las señales correspondientes medidas para el canal de blanco de control, que se usó en línea. El chip se regeneró aplicando un pulso de 2 ml de NaOH 1 mM a un caudal de 25 $\mu\text{l/min}$, seguido por equilibrado con PBS/P. Se pueden determinar nuevamente los parámetros cinéticos con el software BIAevaluation V 3.0 (BIAcore) usando un modelo de unión 1:1 (Langmuir) con la referencia de desviación.

Volviendo al método de la invención, como se ha mencionado anteriormente, la afinidad del reactivo de unión a receptor por la molécula de receptor de la superficie celular no tiene que ser de baja afinidad. Más bien (véase también la Sección experimental), la constante de disociación (K_d) para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor y dicha molécula de receptor puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente 10^{-8} M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente 10^{-9} M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,8 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,6 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,4 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,3 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,2 \times 10^{-9}$, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,15 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} a aproximadamente 10^{-10} , en tanto que, después de la rotura de los complejos de unión multivalentes, la k_{dis} permita la eliminación del reactivo de unión a receptor en un periodo de tiempo y en condiciones de lavado que son aceptables para la célula a teñir o aislar. En una realización, la constante de disociación (K_d) para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor y dicha molécula de receptor puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente 10^{-10} M, o de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente $0,8 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente $0,6 \times 10^{-9}$ M, de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente $0,3 \times 10^{-9}$ M, de $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente 10^{-10} M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,15 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,3 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,6 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,8 \times 10^{-9}$ M. En este contexto se observa que las velocidades k_{as} de hasta aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ son conocidas por la unión de inmunoglobulinas tales como anticuerpos o fragmentos Fab a su antígeno respectivo (véase, por ejemplo, Lee et al., Mol. Biol. (2004) 340, 1073-1093, Fig. 4 en la que el fragmento Fab G6-23 tiene una velocidad k_{as} de $5,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o, por ejemplo, Kwong et al J. Mol. Biol. 31 de diciembre de 2008; 384(5): 1143-1156 o solicitud de patente internacional WO 2010/017103 que informa de valores de k_{as} de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el fragmento Fab de anticuerpo monoclonal anti-NKG2D humano y anticuerpos como IgG1 (véase la Tabla 1 de Kwong et al., arriba). Por consiguiente, suponiendo un reactivo de unión a receptor tal como un fragmento Fab tiene un valor de k_{as} para la unión de la molécula de receptor de $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una K_d de 1×10^{-10} , k_{dis} es 5×10^{-4} M, que convierte tales moléculas de anticuerpo (o reactivos de unión a receptor en general) en muy adecuados para que se usen en el método de tinción reversible de la invención (con una k_{dis} de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ se necesitan solo 1386 segundos o 23 minutos para reducir a la mitad la concentración del complejo entre el reactivo de unión a receptor y la molécula de receptor, a pesar de una afinidad con una K_d de 1×10^{-10} M). Asimismo, como un ejemplo ilustrativo adicional, si el reactivo de unión a receptor tiene un valor de k_{as} para la unión de la molécula de receptor de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una K_d de 1×10^{-9} , la k_{dis} también es 5×10^{-4} M, que también da como resultado una disociación bastante rápida del reactivo de unión a receptor de la célula diana, después de la rotura de los complejos de unión multivalentes. En este contexto, es posible, por ejemplo, usar métodos evolutivos tales como presentación en fagos para cribar deliberadamente reactivos de unión a receptor tales como fragmentos de anticuerpos o, por ejemplo, muteínas de lipocalina (véase también Lee et al., arriba a este respecto). Así, si se desean, se pueden obtener reactivos de unión a receptor con propiedades cinéticas deseadas por tales métodos evolutivos a partir de una molécula de partida de la que se conoce la secuencia de aminoácidos. También es posible usar en el método descrito aquí un reactivo de unión a receptor que tiene una baja afinidad por la molécula de receptor, entonces la constante de disociación (K_d) para la unión entre el reactivo de unión a receptor y la molécula de receptor puede estar en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-7} M.

- El método de tinción comprende además separar la célula teñida de células no diana presentes en una muestra/mezcla de células. La separación se puede llevar a cabo como se describe en la patente de EE.UU. 7.776.562 o la solicitud de patente internacional WO 02/054065 y puede comprender además eliminar dicha tinción de dicha célula rompiendo la unión entre el componente de unión C del reactivo de unión a receptor y los sitios de unión Z del reactivo de multimerización. Este enlace debe ser reversible, es decir, el enlace debe ser capaz de ser roto en condiciones adecuadas para llevar a cabo el método reivindicado. La constante de disociación (K_d) para la unión entre dicho componente de unión C y dichos sitios de unión Z puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente 10^{-13} M. Así, este enlace reversible puede tener, por ejemplo, una K_d de entre aproximadamente 10^{-2} M y aproximadamente 10^{-13} M, o de entre aproximadamente 10^{-5} M y aproximadamente 10^{-3} M, o de entre aproximadamente 10^{-6} M y aproximadamente 10^{-10} M, o de entre aproximadamente 10^{-3} M y aproximadamente 10^{-12} M o entre aproximadamente 10^{-4} M y 10^{-11} M, o entre aproximadamente 10^{-5} M y aproximadamente 10^{-10} M. La K_d de este enlace también se puede determinar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por valoración por fluorescencia, diálisis en equilibrio o resonancia de plasmones superficiales como se ha explicado anteriormente a propósito de la determinación de la velocidad k_{dis} para el enlace formado entre el reactivo de unión a receptor y la molécula de receptor. La disociación/eliminación de la tinción del reactivo de multimerización de las células da como resultado la eliminación del reactivo de unión a receptor disociado, y así del complejo completo de unión multivalente que incluye la marca detectable de la célula previamente teñida. Con el fin de facilitar la eliminación del reactivo de unión a receptor, se podría usar un volumen de tampón de lavado respectivo que lleva la concentración del reactivo de unión a receptor añadido significativamente por debajo de K_d para su interacción con la molécula de receptor relacionada. Alternativamente, se podría repetir el lavado varias veces a volúmenes más bajos y se podría desear agitación suave para prevenir que se vuelvan a unir inmediatamente. En una realización, se usa un volumen del tampón de lavado que reduce la concentración del reactivo de unión a receptor por debajo de la K_d o incluso más preferentemente a una concentración inferior a 1/10 de la K_d de manera que más del 90 % del reactivo de unión a receptor esté presente en la forma disociada (es decir, no unida a la molécula de receptor) o incluso más preferentemente a una concentración inferior a 1/100 de la K_d de manera que más del 99 % del reactivo de unión a receptor esté presente en la forma disociada o incluso más preferentemente a una concentración inferior a 1/1000 de la K_d de manera que más del 99,9 % del reactivo de unión a receptor esté presente en la forma disociada.
- En algunas realizaciones de la invención, el reactivo de unión a receptor se selecciona de forma que comprenda al menos un componente de unión C y el reactivo de multimerización comprenda al menos dos sitios de unión Z, al menos tres o al menos cuatro sitios de unión Z para el componente de unión C. En realizaciones alternativas, es posible usar dos (tipos de) reactivos de unión a receptor diferentes. Cada uno de estos dos reactivos de unión a receptor se unen a la misma molécula de receptor por una mismo sitio de unión B o uno diferente (para el último caso, es posible que los dos reactivos de unión a receptor reconozcan y así se unan a diferentes epítopes sobre la misma molécula de receptor). Además, cada uno de los dos reactivos de unión a receptor tiene al menos un componente de unión C y el reactivo de multimerización tiene al menos un sitio de unión Z para el componente de unión C de cada uno de los dos reactivos de unión a receptor diferentes. Por ejemplo, es posible usar dos reactivos de unión a receptor diferentes, ambos de los cuales se unen a la misma molécula de receptor mediante el mismo sitio de unión B, pero que tienen diferentes componentes de unión C1 y C2. Por ejemplo, un reactivo de unión a receptor puede tener un componente de unión C1 tal como una marca de hexa-histidina y el otro reactivo de unión a receptor tiene un componente de unión C2 tal como una marca FLAG. En tal caso, el reactivo de multimerización puede comprender solo un sitio de unión (Z1) para el componente de unión C1 y solo un sitio de unión para el componente de unión C2. Puesto que en total están presentes dos sitios de unión en el reactivo de multimerización todavía se logra el efecto de avidéz. Un reactivo de multimerización tal podría ser, por ejemplo, un polímero biocompatible (por ejemplo, dextrano u otro polisacárido) con el que se conjuga un fragmento Fab de un anticuerpo anti-FLAG y un fragmento Fab de un anticuerpo anti-marca de hexa-histidina (para una discusión detallada de reactivos de multimerización véase más adelante). Independientemente de si se usan uno o los dos reactivos de unión a receptor con solo uno o dos o más componentes de unión C en la invención, se puede elegir la combinación del componente de unión C y el reactivo de multimerización, en tanto que el componente de unión C y el (los) sitio(s) de unión Z del reactivo de multimerización sean capaces de multimerizarse reversiblemente en un complejo (multivalente) para producir un efecto de avidéz, como también se describe en la patente de EE.UU. 7.776.562 o solicitud de patente internacional WO02/054065.
- En algunas realizaciones ilustrativas, los componentes se pueden elegir del siguiente grupo:
- el componente de unión C comprende biotina y el reactivo de multimerización comprende un análogo de estreptavidina o un análogo de avidina que se une reversiblemente a biotina,
 - el componente de unión C comprende un análogo de biotina que se une reversiblemente a estreptavidina o avidina y el reactivo de multimerización comprende estreptavidina, avidina, un análogo de estreptavidina, o un análogo de avidina que se une reversiblemente a dicho análogo de biotina, o
 - el componente de unión C comprende un péptido de unión a estreptavidina o avidina y el reactivo de multimerización comprende estreptavidina, avidina, un análogo de estreptavidina, o un análogo de avidina que se une reversiblemente a dicho péptido de unión a estreptavidina o avidina. En algunas de estas realizaciones, el componente de unión C puede comprender el péptido de unión a estreptavidina Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys y dicho reactivo de multimerización comprende el análogo de estreptavidina Val⁴⁴.

Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ o el análogo de estreptavidina Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, ambos de los cuales se describen en la patente de EE.UU. 6.103.493, por ejemplo, y están comercialmente disponibles con la marca registrada *Strep-Tactin*®. Los péptidos de unión a estreptavidina podrían ser, por ejemplo, péptidos individuales tales como "Strep-tag®" descrito en la patente de EE.UU. 5.506.121, por ejemplo, o los péptidos de unión a estreptavidina que tienen una disposición secuencial de dos o más módulos de unión individuales como se describe en la publicación de patente internacional WO 02/077018.

En otras realizaciones, en las que solo se usa un componente de unión C, la unión entre el componente de unión C y dichos al menos 2 sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización se produce en presencia de un catión divalente. En un ejemplo ilustrativo de una realización tal, el componente de unión C comprende un péptido de unión a calmodulina y el reactivo de multimerización comprende calmodulina multimérica como se describe en la patente de EE.UU. 5.985.658, por ejemplo. Alternativamente, el componente de unión C puede comprender un péptido FLAG y dicho reactivo de multimerización puede comprender un anticuerpo que se une al péptido FLAG, por ejemplo el péptido FLAG, que se une al anticuerpo monoclonal 4E11 como se describe en la patente de EE.UU. 4.851.341. En otro ejemplo ilustrativo más, el componente de unión C comprende una marca de oligohistidina y el reactivo de multimerización comprende un anticuerpo o un ión de metal de transición que se une a la marca de oligohistidina. La rotura de todos estos complejos de unión se puede llevar a cabo por quelación de ión metálico, por ejemplo quelación de calcio, por ejemplo mediante adición de EDTA o EGTA. Se pueden multimerizar calmodulina, anticuerpos tales como 4E11 o iones metálicos quelados o quelantes libres por métodos convencionales, por ejemplo por biotinilación y complejación con estreptavidina o avidina o multímeros de los mismos o por la introducción de residuos carboxilo en un polisacárido, por ejemplo dextrano, esencialmente como se describe en Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. & Sezaki, H. (1992). "Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. *Bioconjugate Chemistry* 3, 132-137" en una primera etapa y acoplamiento de calmodulina o anticuerpos o iones metálicos quelados o quelantes libres mediante grupos amino primarios con los grupos carboxilo en el polisacárido, por ejemplo esqueleto de dextrano usando química de carbodiimida convencional en una segunda etapa.

En tales realizaciones, se puede romper la unión entre dicho componente de unión C y dichos al menos dos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización por quelación de ión metálico. La quelación de ión metálico se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante adición de EDTA.

En el método de la invención también es posible que el reactivo de multimerización sea un oligómero o un polímero de estreptavidina o avidina o de cualquier análogo de estreptavidina o avidina. Se puede reticular el oligómero o polímero por un polisacárido. En una realización, se preparan oligómeros o polímeros de estreptavidina o de avidina o de análogos de estreptavidina o de avidina por la introducción de residuos de carboxilo en un polisacárido, por ejemplo dextrano, esencialmente como se describe en "Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. & Sezaki, H. (1992). Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. *Bioconjugate Chemistry* 3, 132-137" en una primera etapa. Entonces se acoplan estreptavidina o avidina o análogos de las mismas mediante grupos amino primarios del resto de lisina interno y/o el extremo N libre a los grupos carboxilo del esqueleto de dextrano usando química de carbodiimida convencional en una segunda etapa. Sin embargo, también se pueden obtener oligómeros o polímeros reticulados de estreptavidina o avidina o de cualquier análogo de estreptavidina o avidina reticulando mediante conectores bifuncionales tales como glutardialdehído o por otros métodos descritos en la bibliografía.

En otra realización del método de tinción de la invención, el componente de unión C comprende un antígeno y el reactivo de multimerización comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra dicho antígeno. El antígeno puede ser, por ejemplo, una marca de epítopo. Ejemplos de marcas de epítopos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, marca de Myc (secuencia: EQKLISEEDL), la marca de HA (secuencia: YPYDVPDYA), la marca de VSV-G (secuencia: YTDIEMNRLGK), la marca de HSV (secuencia: QPELAPEDPED), la marca de V5 (secuencia: GKPIPNLLGLDST) o glutatión-S-transferasa (GST), por solo nombrar algunas. En otra realización, el componente de unión C comprende proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a quitina (CBP) o tiorredoxina como antígeno. En estos casos, se puede romper el complejo formado entre los al menos dos sitios de unión Z del reactivo de multimerización (anticuerpo) y el antígeno añadiendo el antígeno libre, es decir, el péptido libre tal como una marca de Myc o la marca de HA (marca de epítopo) o la proteína libre (tal como MBP o CBP). En este contexto se observa que en el caso de que se use la marca de FLAG (secuencia: DYKDDDDK) como componente de unión C y el reactivo de multimerización comprenda un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la marca FLAG, también es posible romper este enlace reversible mediante la adición del péptido FLAG libre.

En el método de la invención, el al menos un sitio de unión B del reactivo de unión a receptor que se une específicamente a dicha molécula de receptor puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo divalente tal como un fragmento (Fab)₂, fragmento Fv de una sola cadena divalente. También podría ser una molécula de unión artificial proteinéica bivalente tal como una muteína de lipocalina dimérica que también se conoce como "duocalina". En otras realizaciones, el reactivo de unión a receptor puede tener un único sitio de unión B, es decir, puede ser monovalente. Ejemplos de reactivos de unión a receptor monovalentes incluyen un fragmento

de anticuerpo monovalente, una molécula de unión proteinéica con propiedades de unión de tipo anticuerpo o una molécula de MHC.

5 Ejemplos de fragmentos de anticuerpos monovalentes incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab, un fragmento Fv y un fragmento Fv de una sola cadena (scFv).

Ejemplos de moléculas de unión proteinéicas con propiedades de unión de tipo anticuerpo que se pueden usar como reactivo de unión a receptor que se une específicamente a la molécula de receptor incluyen, pero no se limitan a, un aptámero, una muteína basada en un polipéptido de la familia de la lipocalina, un glucocorticoide, una proteína basada en el armazón de anquirina, una proteína basada en el armazón de cristalina, una adnectina, un avímero, un dominio de tipo EGF, un dominio Kringle, un dominio de fibronectina de tipo I, un dominio de fibronectina de tipo II, un dominio de fibronectina de tipo III, un dominio PAN, un dominio G1a, un dominio SRCR, un dominio de Kunitz/inhibidor de tripsina pancreática bovina, tendamistat, un dominio de inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal, un dominio Trefoil (tipo P), un dominio de factor de von Willebrand tipo C, un dominio de tipo anafilatoxina, un dominio CUB, una repetición de tiroglobulina tipo I, un dominio de la clase A de receptor de LDL, un dominio Sushi, un dominio Link, un dominio de trombospondina tipo I, un dominio de inmunoglobulina o un dominio de tipo inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpos de dominio o anticuerpos de la cadena pesada de camello), un dominio de lectina de tipo C, un dominio MAM, un dominio de factor de von Willebrand de tipo A, un dominio de somatomedina B, un dominio de cuatro núcleos de disulfuro de tipo WAP, un dominio de F5/8 tipo C, un dominio de hemopexina, un dominio SH2, un dominio SH3, un dominio de tipo EGF de tipo laminina, un dominio C2, "Kappabodies" (Ill. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), "Minibodies" (Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994)), "Janusinas" (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)), un nanocuerpo, una adnectina, una tetranectina, un microcuerpo, una afilina, un anticuerpo o una anquirina, una cristalina, una knotina, ubiquitina, una proteína de dedo de cinc, una proteína autofluorescente, una anquirina o proteína de repetición de anquirina o una proteína de repetición rica en leucina, un avímero (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perloth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, *Nat Biotech*, Dec;23(12):1556-61, publicación electrónica en *Nat Biotech*. 2005 Nov 20 edición); además de proteínas de avímero multivalentes desarrolladas por barajado de exones de una familia de dominios de receptor humano como también se describe en Silverman J, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perloth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP, *Nat Biotech*, Dec;23(12):1556-61, publicación electrónica en *Nat. Biotechnology*. 2005 Nov 20 edición).

En el método de la invención, el poner en contacto la mezcla que contiene la(s) célula(s) diana con el reactivo de unión a receptor y el reactivo de multimerización se puede llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada, como se describe en la patente de EE.UU. 7.776.562 o la solicitud de patente internacional WO 02/054065, por ejemplo. Normalmente, el poner en contacto la mezcla que contiene las células diana con el reactivo de unión a receptor y el reactivo de multimerización y después también la eliminación de dichos reactivos se pueden llevar a cabo a tales temperaturas, a las que sustancialmente no ocurren eventos de activación y/o señalización, que podrían dar como resultado una alteración de la célula diana, por ejemplo el fenotipo de linfocitos T, en caso de que un linfocito T se vaya a teñir o aislar. En algunas realizaciones más preferidas, el poner en contacto se lleva a cabo a una temperatura de ≤ 15 °C o se lleva a cabo a una temperatura de ≤ 4 °C.

En el método de la invención, se puede usar prácticamente cualquiera de dicha célula diana que tiene al menos una molécula de receptor común que se usa para la tinción o aislamiento de la célula diana. Con el fin de lograr un efecto de avidéz, la molécula de receptor normalmente está presente en dos o más copias sobre la superficie de la célula diana. En realizaciones típicas, la célula diana es una célula de mamífero o una célula eucariota o procariota. Asimismo, el al menos un receptor común (específico) que define la población de células diana puede ser cualquier receptor contra el que se puede dirigir un reactivo de unión a receptor como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el receptor puede ser un antígeno que define una población o subpoblación de células, por ejemplo una población o subpoblación de glóbulos sanguíneos, por ejemplo linfocitos (por ejemplo linfocitos T, linfocitos T colaboradores, por ejemplo, linfocitos T colaboradores CD4⁺, linfocitos B o linfocitos citolíticos espontáneos), monocitos, o células madre, por ejemplo células madre periféricas CD34-positivas o células madre que expresan Nanog u oct-4. Ejemplos de linfocitos T incluyen células tales como linfocitos T CD8⁺ específicos de CMV, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T de memoria y linfocitos T reguladores (Treg). Un ejemplo ilustrativo de Treg son células Treg CD4⁺CD25⁺CD45RA⁻ y un ejemplo ilustrativo de linfocitos T de memoria son linfocitos T de memoria central específicos CD62L⁺CD8⁺. El receptor también puede ser un marcador para células tumorales. En este contexto, se observa que el término "células diana" como se usa en el presente documento engloba todas las entidades/vesículas biológicas en las que una membrana (que también puede ser un lípido bicapa) separa el entorno interior del exterior y que comprenden moléculas de receptor específico sobre la superficie de la entidad biológica. Ejemplos de tales entidades incluyen, pero no se limitan a, virus, liposomas y orgánulos tales como mitocondrias, cloroplastos, el núcleo celular o lisosomas.

Una vez se ha aislado, la población de células diana se caracteriza por que el reactivo de unión a receptor se ha

eliminado sustancialmente completamente (normalmente por debajo del límite de detección como se detecta, por ejemplo, por FACS) de dicho receptor. La eliminación completa del reactivo de unión a receptor se lleva a cabo usando el reactivo de unión a receptor reversiblemente multimerizado que tiene una alta velocidad k_{dis} como se ha descrito anteriormente. Haciendo esto, se puede proporcionar una población de células diana (definida por el receptor específico común) que tiene un estado funcional que no se ha alterado por el método de purificación.

El hecho de que la población de células diana o cualquier otra población de una entidad biológica en la que una membrana (que también puede ser un lípido bicapa) separa el entorno interior del exterior y que se caracteriza además por comprender una molécula de receptor específico común sobre la superficie se pueda purificar por los métodos de la invención con eliminación posterior de cualquier reactivo de purificación usado (reactivo de unión a receptor; reactivo de multimerización, marca) ofrece - más allá de la ventaja de que, si la diana es una célula o un orgánulo, no se altera el estado fisiológico - la ventaja reguladora de que los reactivos de purificación no se administran al paciente durante el uso de tales entidades biológicas purificadas como medicamentos. En tales casos, autoridades sanitarias como la FDA (EE.UU.) o EAM (Europa) requieren limitaciones menos caras con respecto a los procesos de producción para dichos reactivos de purificación que en casos en los que el reactivo de purificación se administra junto con el medicamento que es una célula o un liposoma. Por tanto, también existe una clara ventaja técnica con respecto a los métodos de la invención para la purificación de entidades de las que no se puede manipular el estado fisiológico como para liposomas, por ejemplo, si tales liposomas se tienen que purificar y se usan como medicamentos.

La marca que se usa para la detección de células teñidas puede ser cualquier marca que se usa en métodos de diagnóstico y analíticos. Preferentemente, la marca no afecta negativamente las características de las células a teñir o aislar. Ejemplos de marcas son marcas fluorescentes (por ejemplo, ficoeritrina, aloficocianina, cumarina o rodaminas, por solo nombrar algunas), marcas magnéticas, marcas cromóforas, etiquetas de espín adecuadas para resonancia de espín electrónico/resonancia paramagnética electrónica (EPR), o marcas radiactivas. La marca se puede unir al reactivo de unión a receptor y/o el reactivo de multimerización. La marca puede ser una marca directa, es decir, una marca unida a uno de los miembros del complejo de unión multivalente como se especificó anteriormente. En un caso tal, la marca se podría acoplar (conjugarse) covalentemente, por ejemplo, a cualquiera del reactivo de unión a receptor o el reactivo de multimerización (véase el reactivo de multimerización que lleva una marca fluorescente tal como la ficoeritrina mostrada en la Fig. 1). Alternativamente, la marca puede ser una marca indirecta, es decir, una marca que se une a un reactivo adicional que a su vez es capaz de unirse a uno de los miembros del complejo de unión multivalente como se especificó anteriormente. Una marca tal se puede añadir antes, durante o después de que se haya formado el complejo de unión multivalente. Un ejemplo de una marca tal es un bis-, tris- o tetraquis-NTA que contiene colorante fluorescente como se describe por Lata et al., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10205-10215 o Huang et al., Bioconjugate Chem. 2006, 17, 1592-1600. Dicha marca es capaz de unirse no covalentemente (mediante quelación de metales) a una marca de oligohistidina. Así, en este ejemplo, el reactivo de unión a receptor y/o el reactivo de multimerización pueden llevar una marca de oligohistidina (por ejemplo, se puede usar un fragmento Fab como reactivo de unión a receptor que tiene una marca de oligohistidina tal como una marca de hexa-histidina fusionada con el extremo C de CH1 o el dominio CL o una estreptavidina-muteína tal como Strep-Tactin® como reactivo de multimerización que tiene una marca de oligohistidina fusionada con el extremo N o C de una de sus subunidades), siendo así habilitado para unirse no covalentemente a un compuesto colorante fluorescente basado en NTA tal descrito por Lata et al, arriba, o Huang et al, arriba. Una marca que se une no covalentemente tal no necesita unirse necesariamente a su diana (reactivo de unión a receptor y/o reactivo de multimerización) antes de que se forme el complejo de unión multivalente, pero también se puede añadir a la muestra cuando se forma el complejo de unión multivalente o después de que se haya formado el complejo de unión multivalente. Una marca que se une no covalentemente tal también se puede añadir después de que se una el complejo de unión multivalente a las células diana. En lugar del par de unión de colorante fluorescente que comprende NTA:marca de oligohistidina descrito anteriormente, también se puede usar cualquier otro par de unión específica tal como, por ejemplo, digoxigenina y un anticuerpo anti-digoxigenina o fragmento de anticuerpo que lleva la marca fluorescente u otra marca para el marcado indirecto. En tal caso, el reactivo de unión a receptor y/o el reactivo de multimerización se conjugan con/acoplan con digoxigenina y un anticuerpo anti-digoxigenina o fragmento de anticuerpo que lleva la marca se une (mediante digoxigenina) al reactivo de multimerización o reactivo de unión a receptor.

En realizaciones del método de la invención, se tiñe una célula diana y opcionalmente se aísla por medio de un grupo de al menos dos moléculas de receptor diferentes (preseleccionadas). El aislamiento de células diana en nombre de más de un receptor común se puede hacer realizando un método de la invención de una manera secuencial usando reactivos de unión a receptor correspondientes en cada ciclo. En este caso, se puede usar la misma marca para cada ciclo. Alternativamente, es posible el marcado simultáneo de las células diana cuando se usan diferentes marcas para cada molécula de receptor. Un enriquecimiento celular secuencial tal y/o tinción multiparamétrica (simultánea) usa al menos dos reactivos de unión a receptor diferentes, comprendiendo cada reactivo de unión a receptor al menos un sitio de unión B que se une específicamente a una molécula de receptor preseleccionada de un grupo de al menos dos moléculas de receptor diferentes. Hablando ilustrativamente, las al menos dos moléculas de receptor diferentes pueden ser marcadores CD diferentes tales como linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+$, o linfocitos T de memoria central específicos $CD62L^+CD8^+$. Las células pueden ser, por ejemplo, linfocitos T específicos de antígeno tales como linfocitos T $CD8^+$ específicos de CMV que se pueden aislar

seleccionando primero linfocitos T CD8⁺, seguido por una segunda tinción y aislamiento para la población diana específica de CMV tal como linfocitos T CD8⁺ específicos de HLA-B8/IE1K₁₉₉₋₂₀₇.

5 En tales realizaciones, el reactivo de unión a receptor que se une a la segunda molécula de receptor o cualquier molécula de receptor adicional del grupo de al menos dos moléculas de receptor diferentes puede comprender además al menos un componente de unión C.

10 Para la tinción de esta segunda molécula de receptor, la constante de la velocidad de disociación k_{dis} para la unión entre el reactivo de unión a receptor que se une específicamente mediante el sitio de unión B y dicha segunda molécula de receptor o cualquier molécula de receptor adicional también puede tener (al igual que el reactivo de unión a receptor que se une a la primera molécula de receptor) una velocidad k_{dis} de $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor. Alternativamente, en línea con el método de la patente de EE.UU. 7.776.562 o la solicitud de patente internacional WO 02/054065, la constante de disociación (K_d) para la unión entre dicha segunda molécula de receptor o cualquier molécula de receptor adicional y dicho reactivo de unión a receptor que se une específicamente a dicha segunda molécula de receptor o cualquier molécula de receptor adicional puede estar en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-7} M.

20 Como se trata anteriormente, el método de tinción de la invención se puede usar para el aislamiento de una población de células que se define por la presencia de al menos una molécula de receptor específico común. La población de células que se define por la presencia de una molécula de receptor específico común puede, por ejemplo, una población de linfocitos T, que incluye, por ejemplo, una población de linfocitos T específica de antígeno. Esta población de células purificada se puede usar, por ejemplo, para transferencia adoptiva o inmunoterapia.

25 El método de la invención también se puede usar para la determinación del estado funcional de una población de linfocitos T, o para la purificación de una población de linfocitos T para expansión *in vitro*.

30 Con más detalle y según la divulgación de la patente de EE.UU. 7.776.562, el método de la presente invención permite un aislamiento funcional de poblaciones de células diana, por ejemplo de poblaciones de linfocitos T basándose en un procedimiento de tinción reversible. El estado funcional original de células diana, por ejemplo linfocitos T, se puede mantener sustancialmente después de la identificación y purificación. Así, el método de la invención es de amplio beneficio para investigación básica y aplicaciones clínicas.

Ejemplos de aplicaciones preferidas son del siguiente modo:

35 **Investigación básica:**

Investigación directa *ex vivo* del estado funcional de linfocitos tales como linfocitos T que incluyen, por ejemplo, poblaciones de linfocitos T específicas de antígeno. Se sugiere que el estado funcional de poblaciones de linfocitos T *in vivo* es altamente diverso y dependiente de condiciones *in vivo* específicas, pero debido a la falta de herramientas de investigación apropiadas, estos aspectos solo se entienden marginalmente. Con, por ejemplo, multímeros de Fab como se describen aquí, se pueden identificar y purificar poblaciones de linfocitos T específicas de epítipo independientemente de su estado funcional. Sin embargo, la unión de reactivos irreversibles interfiere con los posteriores ensayos funcionales. La tinción reversible de linfocitos T, por ejemplo usando fragmentos Fab equipados con un péptido de unión a estreptavidina/reactivos *Strep-Tactin*®, es una tecnología que permite la investigación *ex vivo* funcional directa de diversas poblaciones de linfocitos T sin alterar.

50 Purificación de poblaciones de linfocitos T para expansión *in vitro* altamente eficiente. La caracterización de poblaciones de linfocitos T obtenidas *ex vivo* requiere frecuentemente además la expansión *in vitro* dando líneas de linfocitos T o clones de linfocitos T.

55 Con las técnicas de multímeros de Fab, se pueden aislar células individuales o subpoblaciones fenotípicas distintas dentro de una diversa población de linfocitos T, pero la unión de los reactivos a TCR interfiere con la eficiencia de la expansión *in vitro*. Este problema experimental se resuelve por tinción reversible de linfocitos T usando los reactivos de la invención, por ejemplo reactivos Fab-*Strep-tag*®/*Strep-Tactin*®. Tales fragmentos Fab podrían llevar como componente de unión C un péptido de unión a estreptavidina que tiene una disposición secuencial de dos o más módulos de unión individuales como se describe en la publicación de patente internacional WO 02/077018.

60 Purificación de poblaciones de linfocitos T para experimentos de transferencia adoptiva. Muchos experimentos *in vivo* en investigación inmunológica requieren la transferencia adoptiva de linfocitos T purificados en animales receptores. Ambos, la pureza de las poblaciones de linfocitos T transferidas y los posibles cambios en las células que se producen durante el procedimiento de aislamiento, son problemas en estos sistemas experimentales. La pureza más alta de las poblaciones de células se logra por métodos de selección positiva, pero los marcadores (normalmente anticuerpos) usados para la identificación son difíciles de eliminar de la superficie de células aisladas y pueden interferir con el resultado de experimentos *in vivo* posteriores.

65 La tinción reversible de linfocitos T usando reactivos de la invención, por ejemplo reactivos Fab *Strep-tag*®/*Strep-*

Tactin® permite la combinación de métodos de selección positiva con la posterior eliminación del marcador de selección y podría mejorar enormemente los experimentos de transferencia adoptiva.

Aplicaciones clínicas:

5 Purificación de poblaciones de linfocitos T para la expansión *in vitro* altamente eficiente. La generación de líneas o clones de linfocitos T humanos (por ejemplo, linfocitos T específicos de patógeno/tumor o autorreactivos) es necesaria en muchas áreas de la investigación clínica, diagnósticos e inmunoterapia. El cultivo *in vitro* se limita frecuentemente por dificultades en las condiciones de normalización para la estimulación específica de antígeno.
 10 Estrategias mejoradas para la purificación de poblaciones de linfocitos T podrían potenciar enormemente la eficiencia de expansión *in vitro*, permitiendo el uso de estimulación independiente de antígeno tal como mitógenos y anti-CD3. Con la invención, por ejemplo con reactivos MHC-*Strep*-tag® o Fab-*Strep*-tag® (como reactivo de unión a receptor) y un reactivo de multimerización *Strep*-Tactin®, se pueden aislar poblaciones de linfocitos T directamente *ex vivo* y expandirse *in vitro* después de la disociación de los reactivos. Se espera que este enfoque sea mucho más eficiente que la purificación usando, por ejemplo, reactivos de multímeros de MHC irreversibles convencionales, ya que la unión de los reactivos interfiere negativamente con la eficiencia de la expansión *in vitro* de linfocitos T.

Purificación de poblaciones de linfocitos T a partir de líneas o clones de células expandidos *in vitro* para análisis o terapia funcional adicional. La expansión *in vitro* de linfocitos T requiere la adición de células presentadoras de antígenos o células nodrizas al cultivo. Para análisis funcionales adicionales, y especialmente para aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, transferencia adoptiva), sería útil eliminar estas células contaminantes. Para procedimientos de selección positiva (que normalmente dan como resultado los grados de pureza más altos), el marcador de selección debe ser extraíble de la superficie de linfocitos T, ya que podría interferir con ensayos funcionales o transferencia adoptiva. Si se usan linfocitos T para aplicaciones *in vivo*, el marcador de selección se debe eliminar además si contiene sustancias que podrían producir complicaciones clínicas tales como reacciones alérgicas. La tinción reversible de linfocitos T, por ejemplo usando MHC-*Strep*-tag® o Fab-reactivos *Strep*-tag®/reactivos *Strep*-Tactin® cumple todos estos criterios.

Purificación *ex vivo* de poblaciones de linfocitos T para "monoterapia adoptiva directa". Es de especial interés clínico el aislamiento de poblaciones de linfocitos T directamente *ex vivo*, seguido por la transferencia inmediata de las células en receptores (sin ninguna propagación *in vitro* adicional). Se espera que las poblaciones de células directamente aisladas sean mucho más eficientes que las células cultivadas para aplicaciones *in vivo*. Se requieren números extremadamente altos de linfocitos T expandidos *in vitro* para la transferencias adoptivas efectivas, un fenómeno lo más probablemente debido a la adaptación de los linfocitos T a condiciones de cultivo *in vitro*. Un ejemplo de una importante aplicación clínica de este procedimiento es la purificación y transferencia adoptiva en paralelo de poblaciones de linfocitos T específicas de VEB y/o CMV durante trasplantes de células madre [por lo demás] agotadas en linfocitos T, cuyo protocolo es probable que reduzca espectacularmente la incidencia de tumores malignos relacionados con VEB y CCMV en pacientes trasplantados. La tinción reversible de linfocitos T y aislamiento, por ejemplo usando MHC-*Strep*-tag® o Fab-*Strep*-tag® como reactivos de unión a receptor y *Strep*-Tactin® como reactivo de multimerización, es un método muy adecuado para estas aplicaciones clínicas. Por ejemplo, moléculas de MHC I (fusionadas con un péptido de unión a estreptavidina) permiten el aislamiento de linfocitos T CD8+ específicos de CMV con alta pureza de leucocitos de sangre de donante; posteriormente, tales células purificadas se transfieren directamente a pacientes inmunodeprimidos que padecen enfermedad por CMV potencialmente mortal (por ejemplo, tras el trasplante de células madre alogénicas). Véase Schmitt et al., (2011) TRANSFUSION, Volumen 51, pág. 591-599 a este respecto. Otros ejemplos incluyen población de linfocitos Treg purificados para su uso en transferencia adoptiva para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como enfermedad injerto contra huésped (GvHD) o rechazo del injerto, o diabetes de tipo 1, colitis o alergia. Para este fin, la población de linfocitos diana Treg puede ser linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ que se tiñen/aíslan de una manera secuencial usando tres reactivos de unión a receptor tales como fragmentos Fab que se unen específicamente a la molécula de receptor de CD4, la molécula de receptor de CD25 o la molécula de receptor CD45RA. Otros ejemplos incluyen el aislamiento de linfocitos citolíticos espontáneos mediante la molécula de receptor de CD56 (también conocida como molécula de adhesión a células neurales (NCAM)) o de células madre hematopoyéticas tales como células madre hematopoyéticas CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, CD133⁺ o Ckit/CD117⁺ mediante la molécula de receptor de la superficie celular respectiva.

Diagnósticos funcionales de linfocitos T.

Las técnicas de multímeros de MHC permiten la cuantificación y caracterización fenotípica de linfocitos T específicos de antígeno directamente *ex vivo*. Sin embargo, la unión de reactivos multímeros a TCR complica el uso de células purificadas en ensayos funcionales (por ejemplo, infecciones crónicas por virus [VIH, CMV, VEB, VHB, VHC], poblaciones de linfocitos T específicas de tumor).

La tinción reversible de linfocitos T y el aislamiento, por ejemplo usando reactivos Fab-*Strep*-tag®/*Strep*-Tactin®, no excluye la posibilidad de la poderosa evaluación de tal estado de linfocitos T en muchas situaciones clínicas.

La invención se ilustrará además por los siguientes ejemplos experimentales.

Ejemplos

Materiales y métodos

5 Muestras de sangre

Se generaron CMSP recientes de cualquiera de sangre periférica o capas leucocitarias por centrifugación sobre solución de separación Biocoll. Se obtuvo sangre periférica de donantes adultos sanos en el Instituto de Microbiología Médica, Inmunología e Higiene (Universidad Técnica de Múnich), y se obtuvieron capas leucocitarias de donantes autólogos de sangre en el Instituto de Anestesiología, Centro Alemán del Corazón de Múnich (Estado de Bavaria y Universidad Técnica de Múnich). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los donantes, y el uso de las muestras de sangre se autorizó según la ley nacional por el Comité local de ética médica (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München).

15 Producción de fragmentos Fab como reactivos de unión a receptor (clonación, expresión, purificación)

Se generaron los dominios variables que se originan del anticuerpo monoclonal anti-CD4 13B8.2 por síntesis génica usando las secuencias descritas en la patente de EE.UU. 7.482.000 y Bes, C., et al., J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003). Las secuencias variables obtenidas se unieron posteriormente con secuencias que codificaban la región constante humana Ch1 tipo κ 1 para la cadena pesada y kappa para la cadena ligera, y la cadena pesada se fusionó terminalmente en carboxi con una disposición secuencial de dos módulos de unión a estreptavidina (SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK), comercialmente disponible como la marca de afinidad One-STrEP-tag de IBA GmbH, Göttingen, Alemania. Toda la clonación se hizo usando el sistema de clonación StarGate® (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) con vectores de fusión adaptados para la expresión de Fab descrita. Se aplicó PCR de mutagénesis para introducir sustituciones de aminoácidos. Tras la clonación, se expresaron las proteínas de fusión Fab-One-STrEP-tag en la cepa JM83 de *E. coli* (Plückthun, A. & Skerra, A. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli. Methods Enzymol 178, 497-515 (1989)). Después de la expresión periplasmática, los fragmentos Fab se purificaron por cromatografía de afinidad en One-STrEP-tag/*Strep*-Tactin® (Schmidt, T.G. & Skerra, A. The *Strep*-tag® system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. Nat Protoc 2, 1528-1535 (2007)) mediante una columna *Strep*-Tactin® Superflow (IBA), liberada de destiobiotina usada para la elución de Fab respectivo de la columna por diálisis y así se transfirió a tampón PBS a pH 7,4 y se guardó en PBS pH 7,4 a 4 °C o se congeló (-20 °C) hasta uso.

35 Multimerización, tinción y análisis de FACS

Para la tinción de una población de células diana específica de moléculas de receptor de CD4 en una mezcla de células, se usó *Strep*-Tactin® marcada con ficoceritina como marca fluorescente (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) como el reactivo de multimerización junto con el fragmento Fab-One-STrEP de unión a CD4 monomérico de las variantes del anticuerpo 13B8.2 (que sirvió de reactivo de unión a receptor) como se describe a continuación. Para el análisis de FACS se incubaron 5×10^5 CMSP con multimeros de Fab que consistían en 0,2 μ g del fragmento Fab (que comprende el sitio de unión B) equipado con One-STrEP-tag (componente de unión C) como reactivo de unión a receptor y 0,75 μ g de *Strep*-Tactin® PE (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) como reactivo de multimerización usando el protocolo de a continuación. Además, después de la separación por FACS, se rompieron los complejos multivalentes en una porción de cada una de las células teñidas mediante adición de biotina como se describe a continuación. Se realizaron tinciones de anticuerpo de control por aplicación concomitante del anticuerpo respectivo: anti-CD4 (OKT4) (de eBiosciences, San Diego, CA, EE.UU.). Después del procedimiento de tinción de la presente invención, las células se teñieron posteriormente con yoduro de propidio para la discriminación vivas / muertas.

50 Protocolo para la tinción de 5×10^5 células con reactivo de unión a receptor y reactivo de multimerización

1. Se incubaron 0,75 μ g de *Strep*-Tactin PE con 0,2 μ g de fragmento Fab-One-STrEP de unión a CD4 monomérico durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad.
2. Se lavaron 5×10^5 células previamente enfriadas con 10 ml de tampón IS (0,5 % de BSA (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 con PBS = Na₂HPO₄ 8,06 mM KH₂PO₄, 1,47 mM, NaCl 137 mM) en un tubo de reacción de 15 ml para eliminar componentes posiblemente existentes como, por ejemplo, D-biotina, que interfieren con el posterior procedimiento.
3. Las células se resuspendieron en 50 μ l de tampón IS y se transfirieron a un recipiente de reacción adecuado para la tinción, por ejemplo una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos.
4. Se añadió a las células la preparación Fab-Streptamer previamente incubada de la etapa 1 y se mezcló minuciosamente por pipeteado suave.
5. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad.
6. Las células se lavaron tres veces por centrifugación (400 x g, 2 min) en 200 μ l de tampón IS.
7. Las células estuvieron a continuación listas para el análisis de FACS o clasificación por FACS, se llevó a cabo análisis de FACS en un CyAn ADP Lx (Beckman Coulter) y se analizaron con el software FlowJo (TreeStar).

Protocolo para la disociación de complejos multivalentes y posterior eliminación del reactivo de unión a receptor de 5×10^6 células con D-biotina

1. Se recogieron 5×10^6 células teñidas (véase anteriormente) por centrifugación (400 x g) y se resuspendieron en 3 ml de tampón IS que contenía D-biotina 1 mM y se incubaron durante 10 minutos a 4 °C.
2. Se sedimentaron por centrifugación las células y se desechó el sobrenadante.
3. Se repitieron las etapas 1 y 2.
4. Las células se resuspendieron en 10 ml de tampón IS y se incubaron durante 10 minutos a 25 °C (para la disociación del fragmento Fab de unión a CD4 usado como reactivo de unión a receptor).
5. Se sedimentaron por centrifugación las células y se desechó el sobrenadante.
6. Se repitieron tres veces las etapas 4 y 5.

Resultados**Principio de tinción reversible de multímeros de Fab**

La base de la presente invención fue el sorprendente descubrimiento de que los reactivos de unión a receptor tales como moléculas de Fab monoméricas que tienen altas afinidades por el receptor celular con una $K_d < 10^{-7}$ de hasta 10^{-10} M necesitan ser multimerizados por un reactivo de multimerización para unión estable a las células diana y se pueden eliminar completamente de la superficie celular tras la rotura dirigida de la interacción entre el componente C y los sitios de unión Z del reactivo de multimerización (**Fig. 1**). Se descubrió además que la base molecular clave para tal tinción reversible no es la constante de afinidad K_d para la interacción entre la molécula de receptor de la superficie celular y el sitio de unión B sobre el reactivo de unión a receptor, sino la velocidad de disociación para la disociación del reactivo de unión a receptor de la molécula de receptor. La velocidad de disociación debería ser $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o más alta para que una molécula de receptor reactivo de unión se pueda eliminar completamente de la célula diana en el plazo de una ventana de tiempo razonable.

Con el fin de demostrar el hallazgo clave de que esta velocidad de disociación y no la afinidad es el parámetro esencial para realizar la tinción reversible de multímeros de Fab, se generaron los siguientes fragmentos Fab recombinantes (que sirven de reactivos de unión a receptor) dirigidos contra la molécula de receptor de la superficie celular CD4:

- 1) Un fragmento Fab que consiste en el dominio variable del anticuerpo murino de unión a CD4 13B8.2 y un dominio constante que consiste en el dominio CH1 humano constante de tipo gamma1 para la cadena pesada y el dominio de cadenas ligeras humanas constantes de tipo kappa, como se describe en la patente de EE.UU. 7.482.000. Este Fab se indica a continuación el fragmento Fab de 13B8.2.
- 2) Un fragmento Fab de 13B8.2 mutante en el que el resto de Phe en la posición 100 de la cadena pesada se mutó a Ala (también denominado en el presente documento *mutante 1 de CD4 (F100A)* y se denomina F100K-H en la patente de EE.UU. 7.482.000, Tabla II)
- 3) Un fragmento Fab de 13B8.2 mutante en el que el resto de Tyr en la posición 92 de la cadena ligera se mutó a Ala (también denominado en el presente documento *mutante 2 de CD4 (Y92A)* y se denomina Y92-L en la patente de EE.UU. 7.482.000, Tabla III)
- 4) Un fragmento Fab de 13B8.2 mutante en que el resto de His en la posición 35 de la cadena pesada se mutó a Ala (también denominado en el presente documento *mutante 3 de CD4 (H35A)* y se denomina H35-H en la patente de EE.UU. 7.482.000, Tabla II)
- 5) Un fragmento Fab de 13B8.2 mutante en que el resto de His en la posición 91 de la cadena ligera se mutó a Ala (también denominado en el presente documento *mutante 4 de CD4 (H91A)* y se denomina H91-L en la patente de EE.UU. 7.482.000, Tabla III)

Estos fragmentos Fab tienen un amplio espectro de afinidades (valores de K_d que oscilan de 12,5 nM a 16,9 μM) y velocidades de k_{dis} crecientes; un resumen de la cinética de unión determinada por BIAcore se enumera en la siguiente Tabla 1.

Fragmento Fab	$k_{as} (10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$k_{dis} (10^{-4} \text{ s}^{-1})$	K_d (nM)
CD4 no mutante (13B8.2)	$0,37 \pm 0,09^{1)}$	$1,11 \pm 0,4^{1)}$	$29,17 \pm 3,27^{1)}$
<i>mutante 1 de CD4 (F100A)</i>	$0,562 \pm 0,003^{2)}$	$4,75 \pm 0,05^{2)}$	$845,1 \pm 47,5^{2)}$
<i>mutante 2 de CD4 (Y92A)</i>	$7,27 \pm 0,2^{3)}$	$10,80 \pm 1,91^{3)}$	$14,75 \pm 2,25^{3)}$
<i>mutante 3 de CD4 (H35A)</i>	$0,0301 \pm 0,200^{2)}$	$18,90 \pm 0,85^{2)}$	$6279,1 \pm 4240^{2)}$
<i>mutante 4 de CD4 (H91A)</i>	$0,0239 \pm 0,002^{2)}$	$40,40 \pm 0,28^{2)}$	$16903,7 \pm 1900^{2)}$

1) Este valor es la media aritmética de las 3 mediciones dadas en Bes, *et al.*
 2) Valor de una única medición como se da en Bes *et al.*,
 3) El valor es la media aritmética de las 2 mediciones dadas en Bes *et al.*,

Con el fin de introducir un componente de unión C, las cadenas pesadas de fragmentos Fab de unión a CD4 se fusionaron genéticamente con una disposición en tándem de dos secuencias de *Strep-tag*®II (SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK comercialmente disponible como la secuencia OneSTrEP-tag de IBA GmbH, Göttingen, Alemania), y ambas cadenas se expresaron simultáneamente en el periplasma de *E. coli*. Los fragmentos Fab funcionalmente ensamblados que sirvieron de reactivo de unión a receptor se purificaron entonces por cromatografía de afinidad sobre una resina *Strep-Tactin*® y, después de eliminar la destiobiotina por diálisis, posteriormente se multimerizaron en presencia de *Strep-Tactin*® marcado con ficoeritrina soluble en agua (*Strep-Tactin*® PE, que sirve de reactivo de multimerización que proporciona al menos 2 (aproximadamente 12) sitios de unión Z para la secuencia de One-StrEP-tag, sirviendo la ficoeritrina de marca (fluorescente)). La interacción entre el péptido de unión a estreptavidina y la estreptavidina-muteína "*Strep-Tactin*®" es reversible tras la adición de D-biotina (o sus derivados tales como diaminobiotina o destiobiotina, por ejemplo) como ligando de competencia.

Para los experimentos de tinción y disociación, se incubaron 5×10^6 CMSP con los complejos multímero de Fab anti-CD4-*Strep-Tactin*® PE respectivos o con los monómeros de Fab correspondientes (los últimos no complejados con *Strep-Tactin*® PE). Mientras que el fragmento Fab no mutante (wt) de 13B8.2 y todos los mutantes mostraron señales de tinción buenas esencialmente iguales cuando se multimerizaron, solo el fragmento Fab wt 13B8.2 y el mutante 1, con velocidades k_{dis} más lentas ($1,11 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $4,75 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), fueron capaces de unirse a su antígeno en un estado monomérico (Fig. 2, primera y segunda columnas). Después de la rotura mediada por D-biotina de los complejos multiméricos (Fig. 2, tercera columna) y posterior lavado, las células se sondaron para fragmentos Fab unidos a la superficie residuales mediante la adición de *Strep-Tactin*® PE solo (sin Fab unido) (Fig. 2, cuarta columna). Como era de esperar de los experimentos de tinción de monómero, no se pudieron detectar monómeros de Fab restantes para los mutantes 2, 3 y 4, mientras que se observó Fab unido a la superficie celular residual sustancial de las variantes de no mutante y mutante 1. Para los mutantes 2, 3 y 4, las células se podrían volver a teñir eficientemente una segunda vez usando marcado de multímeros de Fab una vez más (Fig. 2, quinta columna) que demuestra la coherente eliminación de biotina durante la detección de fragmentos Fab residuales sobre la superficie celular.

Además del análisis basado en citometría de flujo (Fig. 2), también se evaluó la eliminación completa de multímeros de Fab por otro método de análisis independiente, es decir, análisis de transferencia Western (Fig. 3). Confirmando los resultados de FACS altamente sensibles mostrados en la Fig. 2, no pudieron detectarse fragmentos Fab en ninguna de la fracción celular soluble o la insoluble después de la lisis celular para los mutantes 2, 3 y 4, mientras que el fragmento Fab no mutante pudo ser fácilmente detectado en la fracción soluble. Como este experimento también habría detectado fragmentos Fab internalizados, que no habrían sido detectados por FACS, podría descartarse cualquier internalización significativa de los reactivos de unión a receptor unidos en superficie durante el procedimiento de tinción y liberación, confirmando así la correcta interpretación de los resultados mostrados en la Fig. 2. A diferencia del experimento de FACS que demuestra la eliminación incompleta del mutante 1 en las condiciones de lavado usadas, no se pudo detectar el mutante 1 restante en células similarmente tratadas por el experimento de transferencia Western, supuestamente debido a la sensibilidad inferior del método de transferencia Western.

El principal resultado sorprendente es el siguiente: Mientras que, debido a su baja afinidad (K_d de aproximadamente $6,2 \mu\text{M}$ y $16 \mu\text{M}$), la eliminación completa para mutantes 3 y 4 de Fab después de la rotura del complejo multivalente del fragmento Fab respectivo y *Strep-Tactin*® PE como reactivo de multimerización estuvo en línea con la enseñanza de la patente de EE.UU. 7.776.562 o la solicitud de patente internacional WO02/054065, fue completamente inesperada la eliminación completa del fragmento Fab de mutante 2, a diferencia de las moléculas de Fab no mutantes monoméricas (y similares a los fragmentos Fab de mutantes 3 y 4), puesto que se determinó que la afinidad ($K_d = 14,75 \pm 2,25 \text{ nM}$) del mutante 2 era significativamente superior que aquella para el no mutante ($K_d = 29,17 \pm 3,27 \text{ nM}$) y que para todos los otros mutantes. Sin embargo, el mutante 2 se caracteriza por una velocidad de disociación mucho más rápida ($k_{dis} = 10,80 \pm 1,91 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; véase también la Tabla 1) que el fragmento Fab no mutante y el mutante 1 de Fab, que muestran que la velocidad de disociación tiene un efecto dominante sobre la estabilidad de unión de fragmentos Fab monoméricos unidos en la superficie, y no la constante de afinidad. En línea con esta interpretación, todos los fragmentos Fab completamente reversibles (mutantes 2-4) (que son los reactivos de unión a receptor como se define en el presente documento) comparten una velocidad de disociación rápida k_{dis} que es mayor que $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, se debe también observar aquí que, durante la rotura de los complejos de unión multivalentes, con lavado/incubación más largo con la disolución que contiene D-biotina, es posible la inversión completa de la unión del fragmento Fab no mutante y el mutante 1 de Fab - que ambos también tienen una velocidad k_{dis} que es mayor que $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ - dentro de una ventana de tiempo razonable y así se pueden usar como reactivos de unión a receptor según la invención.

En resumen, estos datos demuestran que los reactivos de unión a receptor multimerizados con una velocidad k_{dis} para la unión de una molécula de receptor mediante el sitio de unión B que es mayor que $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (por ejemplo, fragmentos Fab) se pueden usar para teñir células de una manera estable y que estos reactivos se pueden desprender y eliminar completamente de la superficie de células marcadas en condiciones fisiológicas.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de tinción reversible de una célula diana, comprendiendo dicha célula diana una molécula de receptor sobre la superficie de la misma, con una marca detectable, comprendiendo el método:

- 5 poner en contacto una mezcla de células que comprende dicha célula diana con
- (i) un reactivo de unión a receptor, comprendiendo el reactivo de unión a receptor al menos un sitio de unión B, en el que el sitio de unión B se une específicamente a dicha molécula de receptor, en el que la constante de la velocidad de disociación (k_{dis}) como se ha determinado por resonancia de plasmones superficiales para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor mediante el sitio de unión B y dicha molécula de receptor tiene un valor de $0,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, comprendiendo el reactivo de unión a receptor además al menos un componente de unión C, en el que el componente de unión C es capaz de ser reversiblemente unido a un sitio de unión Z de un reactivo de multimerización,
- 10 (ii) un reactivo de multimerización, comprendiendo el reactivo de multimerización al menos dos sitios de unión Z para la unión reversible del componente de unión C del reactivo de unión a receptor, en el que el reactivo de unión a receptor (i) y el reactivo de multimerización (ii) forman complejos de unión multivalentes que se unen a dicha célula diana, comprendiendo cada complejo de unión multivalente al menos dos de dichos reactivos de unión a receptor unidos a uno de dicho reactivo de multimerización, proporcionando dicho complejo de unión multivalente elevada avididad, con respecto a dicho reactivo de unión a receptor; y
- 15 (iii) dicha marca detectable unida o capaz de unirse a dicho complejo de unión multivalente, en el que dicha célula diana se tiñe uniéndose a dicho complejo de unión multivalente a dicha célula diana, y en el que la tinción de dicha célula diana es reversible tras la rotura de la unión entre dicho componente de unión C de dicho reactivo de unión a receptor y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización,
- 20 en el que dicho reactivo de unión a receptor que se une específicamente a dicha molécula de receptor se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo divalente, un fragmento de anticuerpo monovalente, una molécula de unión proteínica con propiedades de unión de tipo anticuerpo y una molécula de MHC,
- 25 en el que dicha célula diana es una célula de mamífero.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la constante de disociación (K_d) para la unión reversible entre dicho sitio de unión Z y dicho componente C está en el intervalo de 10^{-2} M a 10^{-13} M .

3. El método de la reivindicación 1, en el que la constante de la velocidad de disociación (k_{dis}) para la unión entre dicho reactivo de unión a molécula de receptor y dicha molécula de receptor tiene un valor de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, o $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, o $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o mayor.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la constante de disociación (K_d) para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor y dicha molécula de receptor está en el intervalo de $10^{-2} \text{ a } 10^{-10} \text{ M}$.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la constante de disociación (K_d) para la unión entre dicho reactivo de unión a receptor y dicha molécula de receptor está en el intervalo de 10^{-3} M a 10^{-10} M , o 10^{-3} M a 10^{-9} M , o 10^{-3} M a 10^{-8} M , o 10^{-3} M a 10^{-7} M , o 10^{-7} M a 10^{-10} M , o 10^{-7} M a 10^{-9} M .

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además separar dicha célula teñida de células no diana presentes en dicha mezcla de células.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende además eliminar dicha tinción de dicha célula diana rompiendo la unión entre dicho componente de unión C del reactivo de unión a receptor y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que la eliminación del reactivo de multimerización da como resultado una disociación del reactivo de unión a receptor de la célula teñida.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que

- (a) dicho componente de unión C comprende biotina y dicho reactivo de multimerización comprende un análogo de estreptavidina o un análogo de avidina que se une reversiblemente a biotina,
- (b) dicho componente de unión C comprende un análogo de biotina que se une reversiblemente a estreptavidina o avidina y dicho reactivo de multimerización comprende estreptavidina, o avidina, o un análogo de estreptavidina, o un análogo de avidina que se une reversiblemente a dicho análogo de biotina, o

(c) dicho componente de unión C comprende un péptido de unión a estreptavidina o avidina y dicho reactivo de multimerización comprende estreptavidina, o avidina, o un análogo de estreptavidina, o un análogo de avidina que se une reversiblemente a dicho péptido de unión a estreptavidina o avidina.

- 5 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho componente de unión C comprende el péptido de unión a estreptavidina Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys y dicho reactivo de multimerización comprende el análogo de estreptavidina Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ o el análogo de estreptavidina Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷.
- 10 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la unión entre dicho componente de unión C y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización se produce en presencia de un catión divalente.
- 15 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho componente de unión C comprende un péptido de unión a calmodulina y dicho reactivo de multimerización comprende calmodulina, o en el que dicho componente de unión C comprende un péptido FLAG y dicho reactivo de multimerización comprende un anticuerpo que se une al péptido FLAG, o en el que dicha primera unión C comprende una marca de oligohistidina y dicho reactivo de multimerización comprende un anticuerpo que se une a la marca de oligohistidina.
- 20 13. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que la unión entre dicho componente de unión C y dichos sitios de unión Z de dicho reactivo de multimerización se rompe por quelación de ión metálico.
14. El método de la reivindicación 13, en el que la quelación de metales se lleva a cabo mediante adición de EDTA o EGTA.
- 25 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho reactivo de multimerización es un oligómero o un polímero de estreptavidina o avidina o de cualquiera análogo de estreptavidina o avidina.

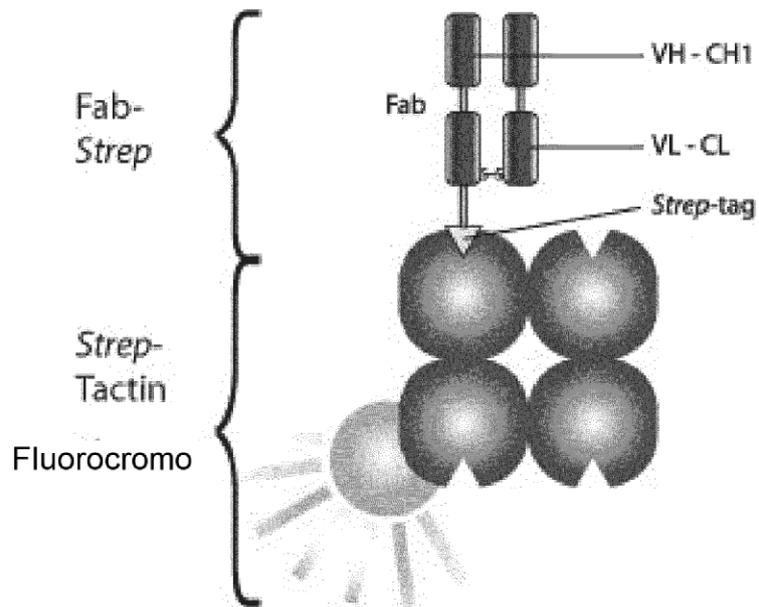


Fig.1a

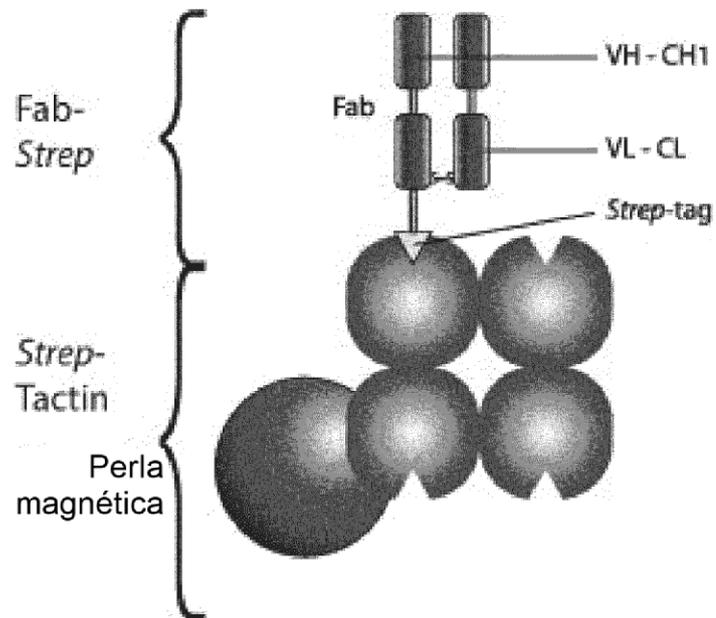


Fig.1b

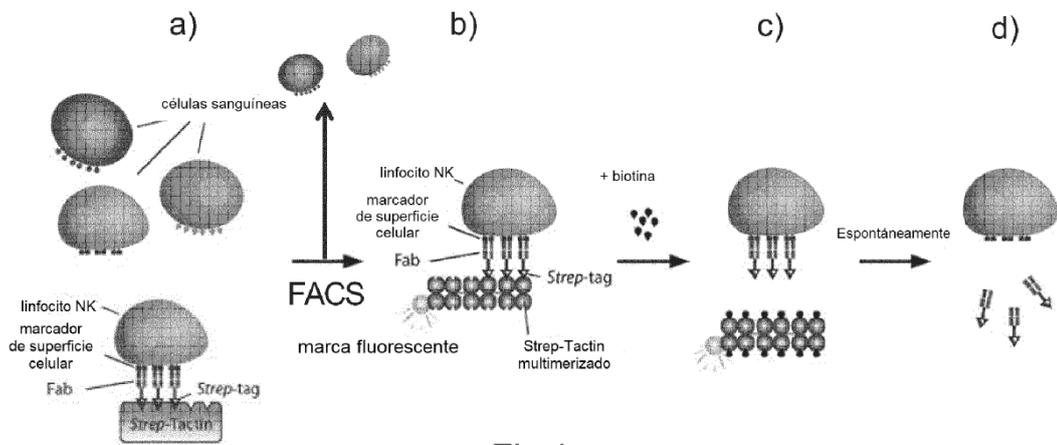


Fig.1c

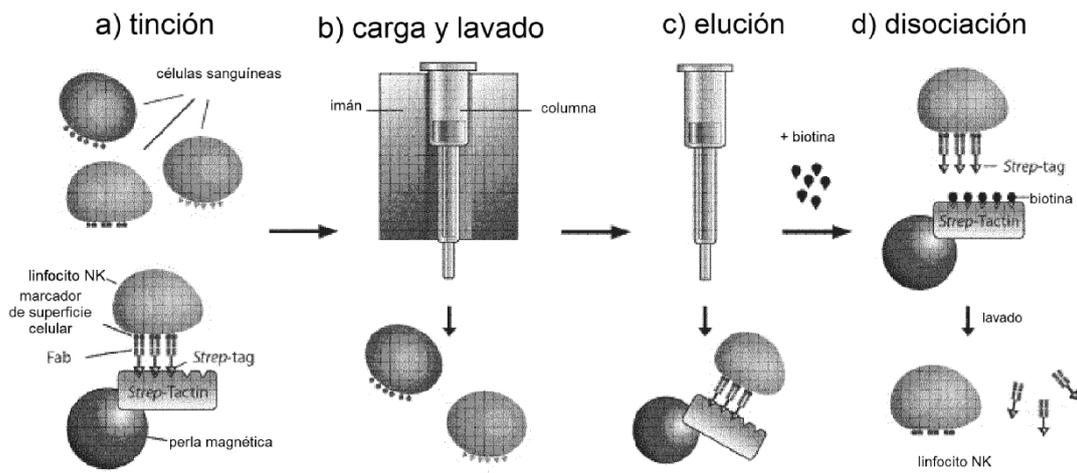


Fig.1d

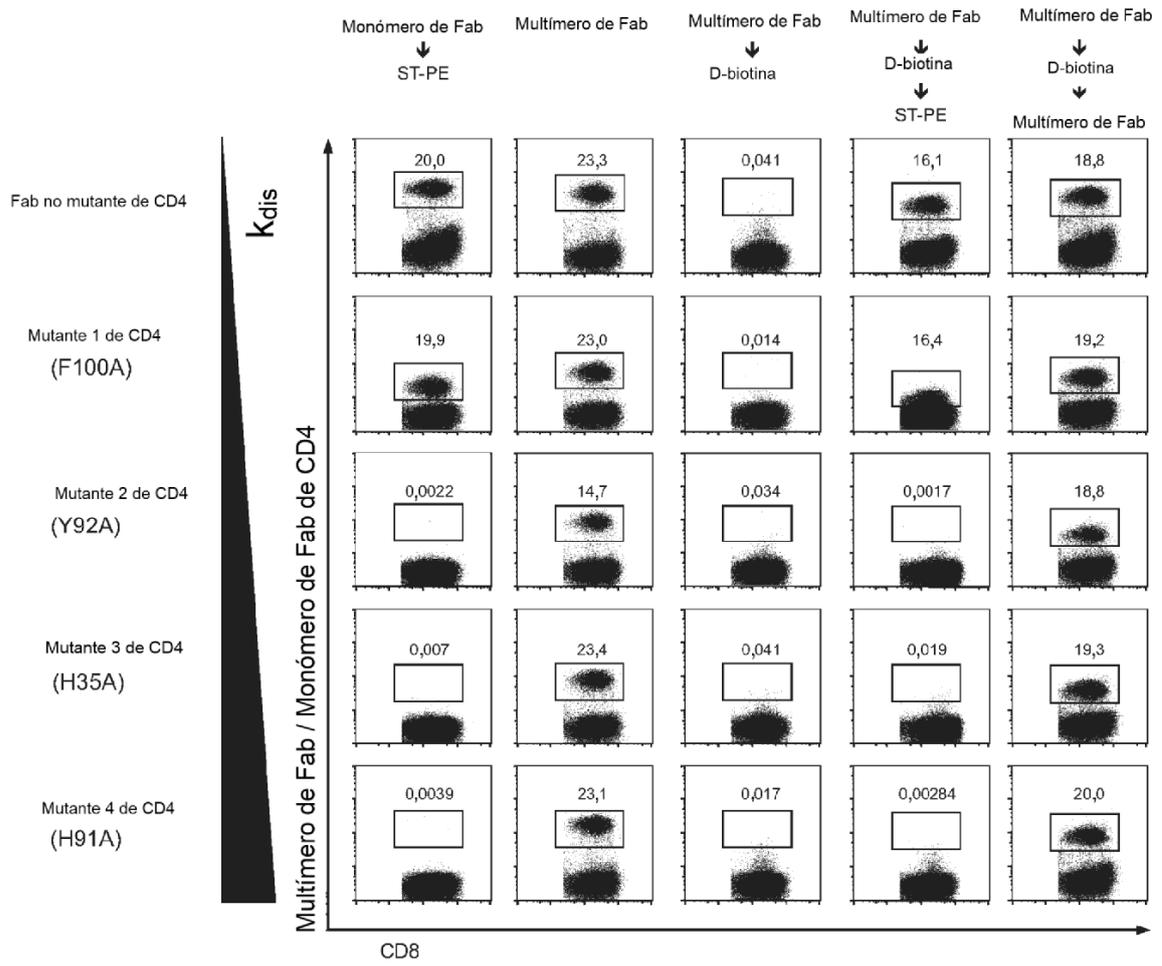


Fig. 2

Fig. 3

