

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 783**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2012 PCT/EP2012/068576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12766050 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2758532**

54 Título: **Métodos de cribado y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.09.2011 GB 201116364

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

22.11.2018

73 Titular/es:

**BIOINVENT INTERNATIONAL AB (100.0%)
223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**FRENDÉUS, BJÖRN y
MATTSSON, JENNY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 690 783 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

Métodos de cribado y usos de los mismos

- 5 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a métodos de cribado mejorados y, en particular, a métodos de cribado de bibliotecas de moléculas dirigidas contra ligandos (antiligandos) para identificar antiligandos específicos de ligandos expresados de forma diferencial y/o infrecuente.
- 10 Las bibliotecas basadas en proteínas o péptidos se usan a menudo para la selección de antiligandos con especificidad por determinados ligandos.
- 15 Dichas bibliotecas se construyen de tal manera que la molécula de proteína está, de alguna manera, físicamente vinculada a la información genética que codifica la molécula de proteína concreta. La molécula de proteína se expresa por tanto junto con su gen.
- 20 los formatos de expresión utilizados comúnmente se basan en partículas hospedadoras de células o virus para presentar la molécula de proteína; e incluyen la expresión en bacterias (Francisco *et al.*, 1993) y la expresión en fagos (Smith, 1985; Smith y Scott, 1993; Winter *et al.*, 1994). Dichos sistemas presentan el antiligandos potencial sobre la superficie de la partícula hospedadora, mientras que la información genética de la molécula presentada se hospeda en el interior de la partícula y dichos métodos se han empleado satisfactoriamente para la selección de antiligandos basada en proteínas específicas.
- 25 Otros formatos de expresión se basan en la existencia de traducción *in vitro*; incluyendo diversas formas de expresión en ribosomas (Mattheakis *et al.*, 1994; Hanes y Pluckthun, 1997; He y Taussig, 1997) que se basan en el enlace no covalente de la información genética a la molécula de proteína; y otros formatos de expresión que se basan también en la traducción *in vitro*, donde existe un enlace covalente entre la información genética y la molécula de proteína anti-ligando potencial, por ejemplo, las tecnologías Profusion (Weng *et al.*, 2002) o Covalent Display (Gao *et al.*, 1997).
- 30 Las bibliotecas de antiligandos peptídicas o proteínas presentadas pueden estar totalmente aleatorizadas, por ejemplo, cuando se usan bibliotecas de péptidos, o pueden estar basadas en la estructura principal de una región constante que incorpora una estructura adicional que confiere variabilidad.
- 35 Las estructuras principales utilizadas a menudo se basan en los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo (McCafferty *et al.*, 1990) pero pueden basarse también en otras estructuras principales tales como fibronectina (Jacobsson y Frykberg, 1995; Koide *et al.*, 1998), dominios de la proteína A (Stahl *et al.*, 1989), o dominios de proteína estables pequeños, por ejemplo, BPTI (Markland *et al.*, 1991).
- 40 La selección de antiligandos que presentan una determinada especificidad de unión, a partir de bibliotecas de expresión, se lleva a cabo a menudo utilizando métodos denominados o selección por afinidad (*biopanning*, en su expresión original).
- 45 El ligando diana puede inmovilizarse sobre una superficie sólida y miembros específicos antiligandos de una biblioteca se exponen al ligando diana inmovilizado para permitir a los antiligandos de interés unirse al ligando diana. Los miembros no unidos de la biblioteca se lavan posteriormente y los antiligandos de interés se recuperan y amplifican.
- 50 Partículas proteínicas diferentes de los miembros de la biblioteca antiligandos, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que se expresan en fagos, pueden "adherirse" dando como resultado la unión y el aislamiento de algunas moléculas no diana específicas. La unión no específica puede minimizarse añadiendo determinados compuestos a la mezcla de construcción de expresión de antiligando/láctea para actuar como agentes bloqueantes para reducir esta unión de fondo de los antiligandos no específicos, por ejemplo, leche, albúmina de suero bovino, suero (humano/feto de ternera), gelatina, y para determinadas aplicaciones (no celulares), detergentes.
- 55 Se han ideado numerosos procedimientos de lavado para reducir la unión no específica de miembros de la biblioteca a células, y para ayudar en la separación de las células de miembros de la biblioteca contaminantes y unidos no específicamente.
- 60 Dichos métodos incluyen el lavado de células fijadas magnéticamente a una columna (Siegel *et al.*, 1997), a fin de minimizar las fuerzas de cizalladura y para permitir el reenlace del fago disociado. Otro método de lavado de células es mediante centrifugación en un medio de mayor densidad tal como Ficoll o Percoll, a fin de eliminar selectivamente antiligandos no específicos y de baja afinidad y para separar adicionalmente las células y los antiligandos unidos a células de los antiligandos libres y de los antiligandos no unidos específicamente (Carlsson *et al.*, 1988; Williams y Sharon, 2002).
- 65 Dependiendo de la eficacia del proceso de selección, pueden requerirse algunos ciclos de purificación por adsorción

para eliminar o al menos reducir suficientemente los antiligandos no específicos hasta un nivel deseable (Dower *et al.*, 1991).

5 En otro método de selección, el(los) ligando(s) diana se unen a los miembros específicos de la biblioteca de antiligandos mientras están en solución. A continuación se aíslan los antiligandos unidos utilizando, por ejemplo, una etiqueta recuperable unida al ligando diana. La etiqueta utilizada más comúnmente es biotina, que permite recuperar el complejo entre la molécula diana y el miembro de la biblioteca específico expresado utilizando avidina acoplada a un soporte sólido, por ejemplo, una perla magnética (Siegel *et al.*, 1997).

10 Estos métodos se usan cuando el ligando diana es bien conocido y está disponible en forma purificada. Las selecciones contra un único ligando diana a la vez son rutinarias. La selección de algunos ligandos diana definidos se puede llevar a cabo de forma simultánea. Los ligandos diana pueden ser uno o más de haptenos pequeños, proteínas, hidratos de carbono, ADN y lípidos.

15 Para muchas aplicaciones, son de interés moléculas específicas antiligando frente a los ligandos expresados diferencialmente. Por ejemplo, las proteínas se pueden expresar diferencialmente sobre las células y tejidos derivados de pacientes con enfermedades, cuando se comparan con aquellos procedentes de controles sanos. Dichas enfermedades incluyen infecciones microbianas, víricas, o parasíticas, asma, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios crónicos, cáncer, enfermedad neurológica, cardiovascular, o gastrointestinal. De forma similar, la composición de proteínas de los fluidos corporales, por ejemplo, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, semen, saliva y moco, pueden diferir entre pacientes con enfermedad en comparación con controles sanos.

20 En consecuencia, además de su aplicabilidad general como herramientas de investigación para identificar ligandos expresados diferencialmente, se pueden usar antiligandos específicos de ligandos expresados diferencialmente como herramientas para su uso en el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad.

30 Recientes avances en los campos de la genómica y la proteómica han indicado la presencia de una multitud de moléculas expresadas diferencialmente todavía indefinidas, que enfatizan la importancia de los métodos para la generación de antiligandos específicos de estos potenciales ligandos diana.

Se espera que muchas de estas moléculas expresadas diferencialmente estén presentes sobre las superficies de las células y constituyan por tanto potenciales dianas para los tratamientos dirigidos utilizando, por ejemplo, anticuerpos específicos que se pueden conjugar con agentes bioactivos (por ejemplo, agentes citotóxicos).

35 Las bibliotecas de expresión de antiligandos grandes y muy diversificadas proporcionan métodos de aislamiento de antiligandos con especificidad por ligandos celulares desconocidos de hidratos de carbono, proteínas, lípidos, o acciones combinadas de los mismos.

40 Los procesos de selección por afinidad actualmente disponibles incluyen métodos basados en células completas, partes de células, y basados en membranas celulares que, en principio, permiten el aislamiento de las construcciones de expresión que presentan antiligandos específicos de ligandos de membranas celulares en su configuración nativa.

45 Los anticuerpos terapéuticos humanos y humanizados se usan de forma creciente para tratar diversas enfermedades incluyendo trastornos inflamatorios agudos y crónicos, trastornos inmunológicos y del sistema nervioso central y cáncer. Los anticuerpos terapéuticos humanos se consideran las modalidades más atractivas para tratar enfermedades humanas debido a su naturaleza completamente humana y la ausencia asociada de inmunogenicidad, capacidad óptima para unirse a un anticuerpo Fc dependiente de mecanismos efectores inmunitarios del hospedador, y su semivida in vivo superior en comparación con sus análogos de murino, quiméricos y humanizados. Los anticuerpos humanos se generan actualmente de forma rutinaria mediante diferentes tecnologías, incluyendo ratones humanizados y bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos muy diversificadas.

50 Las grandes bibliotecas de anticuerpos humanos ($>10^5$ clones de anticuerpos únicos) están suficientemente diversificadas para contener anticuerpos de alta afinidad específicos de un número significativo de antígenos que incluyen virtualmente todos los tipos de autoantígenos. Los autoantígenos son antígenos que a pesar de ser constituyentes de un tejido normal son la diana de una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células, como en una respuesta autoinmunitaria y representa una categoría de antígeno de destacado interés terapéutico.

55 Se cree además que las bibliotecas de anticuerpos humanos proporcionan ventajas en comparación con los ratones transgénicos que transportan genes de la inmunoglobulina humana cuando se seleccionan para determinar anticuerpos que se unen a los epítomos del receptor que se conservan estructuralmente entre hombre y ratón, debido a que esta categoría de anticuerpos se selecciona negativamente in vivo mediante mecanismos de autotolerancia. Dichas regiones conservadas son de particular interés terapéutico debido a que regiones conservadas se asocian a menudo funcionalmente (por ejemplo, dominios de unión a ligando para la unión y la atribución de respuestas celulares inducidas por ligando/receptor), y los anticuerpos que se dirigen a dichos epítomos conservados puede cribarse para la actividad terapéutica in vivo en sistemas de modelos de enfermedad

experimentales singénicos.

Anticuerpos de alta afinidad para virtualmente todos los tipos de antígenos solubles humanos (por ejemplo, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, lípidos, hidratos de carbono y moléculas conjugadas, etc.), así como receptores de la superficie celular (por ejemplo, 1TM, 4TM, 7TM y receptores de purificación por adsorción multi-TM, etc.) se han aislado satisfactoriamente de bibliotecas de anticuerpos humanos muy diversificadas.

Los receptores de la superficie celular constituyen una categoría de dianas de destacado interés terapéutico, y se han homologado algunos anticuerpos que se unen a diferentes receptores asociados a células cancerosas para la terapia contra el cáncer incluyendo rituximab (anticuerpo dirigido contra CD20), trastuzumab (anticuerpo dirigido contra Her2), y cetuximab (anticuerpo dirigido contra EGFR).

La eficacia terapéutica no es, sin embargo, fácilmente predecible con respecto a la especificidad del receptor del anticuerpo; los anticuerpos contra el mismo receptor diana pueden variar mucho en la eficacia terapéutica de forma independiente a su afinidad de unión (Beers et al., 2008; Cragg y Glennie, 2004) y los anticuerpos contra dianas moleculares alternativas pueden mostrar un prometedor, y algunas veces inesperado, potencial terapéutico (Beck et al., 2010; Cheson y Leonard, 2008). Por ejemplo, diferentes clones de anticuerpos específicos de CD20 que se unen con afinidad similar al antígeno de CD20 y transportan regiones constantes idénticas de la IgG2a de ratón, difieren fundamentalmente en la capacidad de agotar linfocitos B in vivo (Beers et al., 2008; Cragg y Glennie, 2004) y anticuerpos contra otros receptores de la superficie celular asociados a tumores diferentes de CD20 pueden tener una actividad antitumoral significativa contra los cánceres de linfocitos B (para una revisión véase (Cheson y Leonard, 2008)).

Por tanto, en una biblioteca de anticuerpos muy diversificada, es probable que los anticuerpos terapéuticamente más eficaces, potentes y mejor tolerados con respecto a cualquier tipo dado de cáncer sean específicos de cualquiera de diversos receptores diferentes, e identificar los clones de anticuerpos terapéuticamente óptimos en una biblioteca muy diversificada requiere un cribado funcional de múltiples, e idealmente todos, los miembros de la biblioteca que son específicos para diferentes receptores asociados a células enfermas.

El solicitante ha desarrollado previamente tecnología de cribado (un método de selección por afinidad) que permite la recuperación de clones de anticuerpos que se unen a diferentes receptores de la superficie que se expresan diferencialmente en una población celular (células diana) en comparación con otros (células no dianas) procedentes de bibliotecas de anticuerpos que expresan fagos humanos (documento WO2004/023140, Fransson et al., 2006; Frenéus, 2006) (conocido a partir de ahora en el presente documento como selección por afinidad diferencial).

Shinohara *et al*, 2000 (*Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97(6):2585-2590) se refiere al aislamiento de un anticuerpo monoclonal específico de una pared vascular celular utilizando una estrategia que consiste en (i) el aislamiento de paredes celulares de células de *Zinnia* que se diferencian de forma sincrónica, (ii) la generación de mAb con un método de expresión en fago de anticuerpos, y (iii) el cribado con un método de sustracción. Boel *et al*, 1998 (*Infect. Immun.*, 66(1):83-88) se refiere al uso de la purificación por adsorción competitiva para seleccionar un panel de 10 anticuerpos humanos diferentes a partir de una biblioteca de expresión en fago semisintética que distingue entre cepas resistentes al complemento sérico y cepas sensibles al complemento del diplococo *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. Shinohara y Fukuda, 2002 (*J Immunol. Methods*, 264(1-2):187-194) se refiere al uso de una combinación de tecnología de anticuerpos de expresión en fagos y un método de sustracción para el aislamiento de biomarcadores novedosos en paredes celulares vasculares de plantas.

Este proceso de cribado consiste esencialmente en seis etapas, como se ha reseñado en la Figura 1. De manera importante, este proceso comprende etapas de cribado en el siguiente orden:

- 1) selección por afinidad diferencial, seguida por
- 2) cribado para la especificidad diana frente a no diana, seguida por
- 3) secuenciación convencional mediante tecnología de Sanger de un número más pequeño de clones.

Utilizando esta tecnología fue posible generar un combinado de anticuerpos que mostró una alta especificidad por la célula diana frente a los receptores superficiales expresados diferencialmente por la célula diana frente a la célula no diana.

La secuenciación de Sanger es un ejemplo de una técnica que se utiliza actualmente para identificar aglutinantes únicos en una manera de bajo rendimiento. Otros ejemplos incluyen el análisis del ADN génico del anticuerpo sobre geles antes y después de la digestión con enzimas de restricción para desvelar tamaños únicos y a través de sensibilidades diferentes a diferentes enzimas de restricción, indirectamente, secuencias diferentes.

Cuando se aplicó a anticuerpos aislantes que se dirigían a linfocitos B cancerosos (diana) frente a receptores superficiales expresados diferencialmente de linfocitos T (no diana) (selección por afinidad diferencial "BnonT"), este proceso identificó anticuerpos específicos para diferentes receptores superficiales expresados diferencialmente de células diana, incluyendo HLA-DR, Ig superficial, e ICAM-1 (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias y especificidades de los anticuerpos aislados mediante la metodología de cribado existente, por ejemplo, selección por afinidad diferencial secuencial, cribado para la unión, y secuenciación de Sanger, direccionamiento de linfocitos B cancerosos frente a receptores superficiales que expresaban diferencialmente linfocitos T (selección por afinidad diferencial "BnonT")

Secuencia de anticuerpos	N.º de clones (de los 81 ensayados)	Especificidad
n.º 1	71	sIgM
n.º 2	4	HLA-DR
n.º 3	1	ICAM-1
n.º 4	1	sIgM
n.º 5	1	sIgM
n.º 6	1	sIgM
n.º 7	1	sIgM
n.º 8	1	sin determinar

5 Sin embargo, los receptores dirigidos estuvieron relativamente muy expresados (50.000 - 400.000 receptores por célula), y el número de secuencias únicas de anticuerpos identificadas (8 de 81 cribadas) mediante este proceso fue limitado.

10 Aunque solo se secuenciaron un número limitado de receptores superficiales expresados diferencialmente por las células diana específicos de clones, la alta frecuencia de un clon de anticuerpo indicó una diversidad limitada de anticuerpos en el combinado de anticuerpos "BnonT" recuperado. Por tanto, aunque la tecnología proporcionó una mejora significativa en las técnicas de purificación por adsorción basadas en células previas, en el sentido que los anticuerpos con potencial terapéutico de diversos receptores expresados diferencialmente diferentes se identificaron
 15 mediante un esfuerzo de cribado limitado (Fransson et al., 2006), esta observación mostró que se requirieron mejoras adicionales debido a que, de acuerdo con la visión común prevalente, la purificación por adsorción generó solamente un combinado de anticuerpos de diversidad limitada y consistente en anticuerpos contra receptores superficiales muy expresados y expresados de forma fuertemente diferencial (Hoogenboom, 2002) (Liu et al., 2004; Mutuberria et al., 1999; Osbourn et al., 1998).

20 Se llevaron a cabo cálculos mediante simulación informática como se enseñó inicialmente en el método de selección por afinidad (documento WO2004/023140 y Frenéus, 2006) indicándose, que el combinado de anticuerpos "BnonT" seleccionado diferencialmente debería contener un número mucho mayor de anticuerpos contra cada uno de los diversos receptores superficiales expresados diferencialmente (Figura 2).

25 Las capacidades de secuenciación en este momento hacían que la secuenciación de un número significativamente mayor de clones de anticuerpos en el combinado fuera extremadamente difícil (prácticamente inviable), por tanto, la hipótesis que el combinado de anticuerpos seleccionado diferencialmente debería estar mucho más diversificado que lo aparente por los cribados iniciales se ensayó utilizando una estrategia indirecta. Por tanto, utilizando
 30 inmunoperlas conjugadas con la proteína ICAM-1 recombinante (siendo ICAM-1 un receptor de la superficie celular dirigido por un único clon de anticuerpo de los inicialmente 81 clones secuenciados en el combinado de anticuerpos de la Tabla 1 seleccionado diferencialmente), el combinado de anticuerpos "BnonT" seleccionado diferencialmente se sometió a purificación por adsorción para la presencia de clones de anticuerpos específicos de ICAM-1 adicionales. El cribado de 1260 clones de anticuerpos recuperados tras la purificación por adsorción del combinado
 35 de anticuerpos seleccionados diferencialmente contra ICAM-1 recombinante, identificó veintiún (21) secuencias/clones de anticuerpos específicos de ICAM-1 adicionales.

40 Estas observaciones demostraron que el método de selección por afinidad diferencial original podía identificar clones de anticuerpos contra antígenos expresados diferencialmente pero que el combinado de anticuerpos seleccionado diferencialmente estaba mucho más diversificado que lo que era evidente a partir de estos cribados iniciales y significativamente más que lo determinado por las estrategias de cribado convencionales

45 El solicitante ha ideado ahora una manera de mejorar la precisión del método de selección por afinidad diferencial para detectar una pluralidad de antilíngandos diferentes de un ligando de interés. La presente divulgación describe por tanto una metodología que permite la recuperación de un combinado de antilíngandos de alta afinidad tal como anticuerpos humanos que son específicos de diferentes ligandos (por ejemplo, receptores) expresados diferencialmente en su configuración superficial celular nativa en niveles de bajos a altos en una población de células diana en comparación con otra(s) población(ones) de células, a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos (y otras bibliotecas moleculares).

50

El método divulgado en el presente documento difiere de las metodologías de cribado ideadas anteriormente en algunos aspectos (Figura 8). En primer lugar, al combinar de forma única una potente metodología de selección por afinidad diferencial con la secuenciación profunda avanzada y el posterior cribado confirmatorio para la especificidad de anticuerpos para los receptores superficiales expresados superficialmente en la célula diana - "cribado inverso", el método divulgado en el presente documento permite la generación de un combinado de anticuerpos que es 1) cualitativa y 2) cuantitativamente único.

De manera importante, los antiligandos, tales como clones de anticuerpos, identificados mediante esta estrategia pueden tener potencial terapéutico debido a que se basan en primer lugar en, su alta afinidad de unión con receptores que se a) expresan diferencialmente en células diana frente a células no diana y b) que se expresan en su configuración superficial celular nativa en las células diana, y, en segundo lugar, la capacidad documentada de los anticuerpos con estas propiedades de mediar efectos terapéuticos en sistemas de modelos de enfermedad experimentales relevantes *in vitro* e *in vivo* (Beck et al., 2010; Fransson et al., 2006).

En resumen, por lo tanto, el método de la presente divulgación permite:

1. La generación de un combinado de anticuerpos mediante selección por afinidad diferencial para contener anticuerpos específicos de los receptores superficiales expresados diferencialmente que se expresan a niveles altos, intermedios y bajos
2. Existe un umbral más bajo para el número de clones de anticuerpos secuenciados, que debe excederse a fin de identificar anticuerpos específicos para receptores superficiales expresados a nivel intermedio y bajo
3. Por encima de este umbral más bajo, la secuenciación de un número creciente de clones de anticuerpos aumenta el número de anticuerpos identificados específicos de receptores superficiales expresados a nivel intermedio y bajo.
4. La identificación comprehensiva de anticuerpos específicos de receptores superficiales expresados a nivel intermedio y bajo en el combinado de anticuerpos expresado diferencialmente requiere una secuenciación profunda.

Las realizaciones de la invención se describen en los siguientes párrafos numerados:

(1). Un método de aislar al menos un antiligando, en el que el antiligando es un polipéptido, frente a al menos un ligando diana expresado diferencialmente, en el que el ligando diana es un antígeno de la superficie celular, en el que el ligando diana expresado diferencialmente es un ligando de baja expresión, en el que el ligando de baja expresión se expresa a entre 5.000 y 20.000 copias por célula, en el que el método comprende las etapas de:

(a) llevar a cabo la selección por afinidad diferencial sobre una biblioteca de moléculas antiligandos con el fin de aislar al menos un antiligando, en el que la etapa de selección por afinidad diferencial comprende además las subetapas de:

- (i) proporcionar una biblioteca de antiligandos;
- (ii) proporcionar una primera población de ligandos que comprende un ligando fijo a o incorporado en una construcción de ligando sustractor;
- (iii) proporcionar una segunda población de ligandos que comprende el mismo ligando que en la etapa (ii), fijo a o incorporado en una construcción de ligando diana;
- (iv) determinar una cantidad de la construcción del ligando sustractor y la construcción del ligando diana en las poblaciones que utilizan una o más ecuaciones derivadas de la ley universal de acción de masas

$$\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} = K_{eq}$$

donde:

A, B, C y D = son los participantes en la reacción (reactivos y productos)
a, b, c, y d = los coeficientes necesarios para obtener una ecuación química equilibrada

con el fin de permitir el aislamiento de una molécula dirigida contra ligando para un ligando diana expresado diferencialmente, en el que la ecuación es cualquiera de:

$$bA = \frac{(A + T + (K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxV))^2}{4} - AxT}$$

donde

bA = Antiligando unido
 A = Número total de antiligandos
 T = Número total de ligandos
 C = Constante de Avogrado ($6,022 \times 10^{23}$ partículas/moles)
 V = Volumen de reacción (litros)
 K_d = Constante de disociación en equilibrio

o

$$bA = \left\{ \frac{(A+T+(K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A+T+(K_d)x(CxV))^2}{4} - AxT} \right\} x \left\{ \frac{(T_p x C_p)}{((T_p x C_p) + (T_s x C_s))} \right\}$$

donde

bAp = Antiligando unido
 T_p = El número de ligandos en C_p
 T_s = el número de ligando en C_s
 C_p = el número de construcciones de ligandos diana
 C_s = El número de construcciones de ligandos sustractores

A = El número total de antiligandos
 T = el número total de ligandos
 C = Constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ partículas/moles)
 V = Volumen de reacción (litros)
 K_d = Constante de disociación en equilibrio;

(v) proporcionar la cantidad de construcción de ligando sustractor como se determina en la etapa (iv);
 (vi) proporcionar la cantidad de construcción de ligando diana como se determina en la etapa (iv);
 (vii) proporcionar medios de separación para aislar el antiligando unido a la construcción del ligando diana a partir de un antiligando unido a una construcción de ligando sustractor;
 (viii) exponer la biblioteca de (i) a las construcciones de ligandos proporcionadas por (v) y (vi) para permitir la unión de antiligandos a ligandos; y
 (ix) utilizar los medios de separación para aislar el antiligando unido al ligando fijo a o incorporado en la construcción del ligando diana;

(b) a continuación llevar a cabo la secuenciación de alto rendimiento sobre los antiligandos aislados durante la etapa (a); y,

(c) a continuación llevar a cabo el cribado confirmatorio de la unión específica del antiligando para el ligando expresado diferencialmente.

(2). El método del párrafo 1 en el que el antígeno de la superficie celular está en su forma nativa, opcionalmente en el que el antígeno de la superficie celular está en un receptor superficial celular.

(3). El método de los párrafos 1 o 2 en el que la etapa de secuenciación de alto rendimiento se lleva a cabo mediante la secuenciación 454, Métodos Illumina, SOLiD o el sistema Helicos, y/o; en el que la etapa de cribado confirmatorio se lleva a cabo mediante citometría de flujo, FMAT, ELISA, MSD o CBA.

(4). El método del párrafo 1 en el que el ligando no se expresa en uno tanto de la construcción diana como de la construcción del sustractor, y/o; que comprende además una etapa de liberar el antiligando del ligando.

(5). El método de los párrafos 1 o 4 por el cual se llevan a cabo las etapas (ii) a (ix) en paralelo para aislar una pluralidad de moléculas dirigidas contra ligandos de una pluralidad de diferentes ligandos, y/o; por lo cual las etapas (ii) a (ix) se repiten una o más veces.

(6). El método de los párrafos 1, 4 o 5 en el que la cantidad de una de la construcción del sustractor o la construcción diana se proporciona en exceso de la cantidad de la otra construcción del sustractor o de la construcción diana, en el que el exceso de ligando está entre 10 y 1000 veces, o 2 y 10 veces, o 1000 y 1.000.000 veces.

(7). El método del párrafo 1 o 4 a 6 en el que los medios de separación se seleccionan entre al menos uno de un soporte sólido, una membrana celular y/o partes de la misma, una membrana sintética, perlas, etiquetas químicas y ligandos libres.

(8). El método del párrafo 1 o 4 a 7 por el cual los medios de separación de las construcciones del sustractor y diana tienen una densidad diferente.

5 (9). El método del párrafo 1 o 4 a 8 en el que los medios de separación de la construcción del sustractor son una vesícula de la membrana o una membrana celular completa.

10 (10). El método del párrafo 1 o 4 a 9 por el cual se lleva a cabo la etapa (ix) mediante al menos una centrifugación en gradiente de densidad, secuestro en soporte sólido, el secuestro de perlas magnéticas, la unión a una etiqueta química y el reparto en fase acuosa.

(11). El método de cualquiera de los párrafos 1 a 10 en el que la biblioteca de la etapa (a) es una biblioteca de expresión que comprende una pluralidad de miembros de la biblioteca que expresa antiligandos, en el que opcionalmente, la biblioteca de expresión es una biblioteca de expresión en fagos.

15 (12). El método de cualquiera de los párrafos 1 a 11 en el que el ligando es al menos uno seleccionado entre antígenos; ligandos de receptores; y dianas enzimáticas que comprenden al menos uno entre hidratos de carbono; proteínas; péptidos; lípidos; polinucleótidos; moléculas inorgánicas y moléculas conjugadas.

20 (13). El método de cualquiera de los párrafos 1 a 12 en el que la biblioteca de antiligandos se construye a partir de al menos uno entre anticuerpos, y variantes de unión a antígenos, derivados o fragmentos de los mismos; moléculas que forman parte de estructuras principales con superficies variables diseñadas mediante ingeniería genética; receptores; y enzimas.

25 (14). El método del párrafo 1 o 4 a 13 que comprende una etapa adicional de exponer el ligando y sus medios de separación a un estímulo que influya en la expresión de los ligandos diana en dichas construcciones de ligandos.

Se divulga en el presente documento un método para aislar al menos un antiligando de al menos un ligando diana expresado diferencialmente que comprende las etapas de:

30 (a) llevar a cabo una selección por afinidad diferencial sobre una biblioteca de antiligandos con el fin de aislar al menos un antiligando; y

(b) llevar a cabo la secuenciación de alto rendimiento en los antiligandos aislados durante la etapa (a).

35 El método puede comprender además la etapa de:

(c) llevar a cabo el cribado confirmatorio para la especificidad del anticuerpo para el ligando expresado diferencialmente

40 La etapa de selección por afinidad del método divulgado en el presente documento puede comprender las subetapas de:

(i) proporcionar una biblioteca de antiligandos;

45 (ii) proporcionar una primera población de ligandos que comprende un ligando fijo a o incorporado en una construcción de ligando sustractor;

(iii) proporcionar una segunda población de ligandos que comprende el mismo ligando que en la etapa (ii), fijo a o incorporado en una construcción de ligando diana;

50 (iv) determinar una cantidad de la construcción del ligando sustractor y la construcción del ligando diana en las poblaciones que utilizan una o más ecuaciones derivadas de la ley universal de acción de masas

$$\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} = K_{eq}$$

donde:

55 A, B, C y D = son los participantes en la reacción (reactivos y productos)

a, b, c, y d = los coeficientes necesarios para obtener una ecuación química equilibrada

con el fin de permitir el aislamiento de un antiligando de un ligando diana expresado diferencialmente;

60 (v) proporcionar la cantidad de construcción de ligando sustractor como se determina en la etapa (iv);

(vi) proporcionar la cantidad de construcción de ligando diana como se determina en la etapa (iv);

(vii) proporcionar medios de separación para aislar el antiligando unido a la construcción del ligando diana a partir de un antiligando unido a una construcción de ligando sustractor;

5 (viii) exponer la biblioteca de (i) a las construcciones de ligandos proporcionadas por (v) y (vi) para permitir la unión de antiligandos a ligandos; y

(ix) utilizar los medios de separación para aislar el antiligando unido al ligando fijo a o incorporado en la construcción del ligando diana.

10 No se pretende que las etapas del método divulgado en el presente documento tengan necesariamente que llevarse a cabo en cualquier orden específico.

15 Por "proporcionar la cantidad determinada" los inventores incluyen el significado de proporcionar una cantidad de ligando que se conocía ya, de tal manera que las ecuaciones divulgadas en el presente documento se han utilizado para verificar que la cantidad conocida proporcionada es adecuada para aislar el(los) antiligando(s) deseado(s).

20 Los parámetros de reacción que se utilizan para un proceso de selección dado pueden optimizarse de acuerdo con la presente divulgación mediante cálculos que aplican la Ley de acción de masas y ecuaciones derivadas de los anteriores, y adoptando parámetros tales como la diversidad de la biblioteca molecular, el número de copias contra ligandos, el límite de detección deseado de la regulación por exceso, la afinidad antiligando deseada, y la concentración de ligando en consideración.

25 La etapa de secuenciación de alto rendimiento del método del primer aspecto puede llevarse a cabo mediante la secuenciación 454, métodos Illumina, SOLiD, el sistema Helicos o aquellos de Complete Genomics y Pacific Biosciences

30 La aparición de la siguiente generación de secuenciación ha permitido secuenciar grandes cantidades (miles a millones) de genes candidatos en una manera de alto rendimiento (a partir de aquí se denomina "secuenciación profunda").

35 la secuenciación 454 se describe por Margulies et al. (2005). En el método 454, el ADN que se va a secuenciar es bien fraccionado y suministrado con adaptadores o bien, los segmentos de ADN se pueden amplificar mediante la PCR utilizando cebadores que contienen los adaptadores. Los adaptadores son nucleótidos 25-mer requeridos para la unión a perlas de captura de ADN y para hibridar la emulsión de los cebadores de amplificación de la PCR y el cebador de secuenciación. Los fragmentos de ADN se preparan monocatenarios y se unen a las perlas de captura de ADN de una manera que permite que se una solo un fragmento de ADN a una perla. A continuación, las perlas que contienen el ADN se emulsionan en una mezcla de agua en aceite dando como resultado microrreactores que contienen exactamente una perla.

40 En el microrreactor, el fragmento se amplifica mediante la PCR, dando como resultado un número de copias de varios millones por perla. Tras la PCR, la emulsión se rompe y las perlas se cargan en una placa de picrovaloración. Cada pocillo de la placa de picrovaloración puede contener solo una perla. Las enzimas de secuenciación se añaden a los pocillos y se hacen fluir los nucleótidos a través de los pocillos en un orden fijo. La incorporación de un nucleótido da como resultado la liberación de un pirofosfato, que cataliza una reacción que conduce a una señal quimioluminiscente. Esta señal se registra por una cámara CCD y se usa un software para traducir las señales en una secuencia de ADN.

50 En el método Illumina (Bentley (2008)), fragmentos monocatenarios suministrados con adaptador se unen a una superficie ópticamente transparente y se someten a una "amplificación en puente". este procedimiento da como resultado varios millones de clústeres, conteniendo cada uno copias de un único fragmento de ADN. Se añadieron ADN polimerasa, cebadores y cuatro nucleótidos terminadores reversibles marcados y la superficie se visualizó mediante fluorescencia láser para determinar la localización y la naturaleza de las marcas. A continuación se eliminaron los grupos protectores y se repitió el proceso durante varios ciclos.

55 El proceso SOLiD (Shendure (2005)) es similar a la secuenciación 454, se amplificaron fragmentos de ADN sobre la superficie de las perlas. La secuenciación implica ciclos de ligadura y la detección de las sondas marcadas.

60 Se están desarrollando actualmente algunas otras técnicas para la secuenciación de alto rendimiento. Los ejemplos de las mencionadas son el sistema Helicos (Harris (2008)), Complete Genomics (Drmanac (2010)) y Pacific Biosciences (Lundquist (2008)). Como este es un campo técnico que se desarrolla rápidamente, la aplicabilidad a la presente divulgación de los métodos de secuenciación de alto rendimiento será obvia para una persona experta en la materia

65 Aunque los instrumentos capaces de secuenciar tramos largos de ADN, tales como los que codifican los dominios variables del anticuerpo (Fv), las secuencias de scFv o Fab están solo en una etapa prototípica, los instrumentos disponibles actualmente permiten secuenciar tramos más cortos de ADN tales como las secuencias que codifican, y

que abarcan, los dominios CDRH1 a CDRH3 de scFv. Sin embargo, ya que la tecnología de secuenciación mejora para permitir la secuenciación de tramos largos del ADN, estas técnicas trabajarán bien en los métodos divulgados en el presente documento.

5 La etapa confirmatoria del cribado del método divulgado en el presente documento puede llevarse a cabo detectando la unión específica del ligando del combinado de antiligandos aislados y/o de los clones antiligandos individuales de una construcción diana frente a una construcción del sustractor utilizando cualquier ensayo que se dirija a la unión del ligando/antiligando, por ejemplo, Citometría de flujo, FMAT (tecnología de ensayos microvolumétricos fluorescentes), ELISA (Enzimoimmunoanálisis de adsorción), MSD (Meso Scale Discovery) y CBA
10 (Matriz citométrica de perlas).

En una opción divulgada en el presente documento, el ligando del método no se expresa en uno tanto de la construcción diana como de la construcción del sustractor, es decir, se expresa solo en uno de la construcción diana o la construcción del sustractor.
15

En otra opción, el ligando del método se expresa en niveles mayores en uno tanto de la construcción diana como de la construcción del sustractor.

20 El método de selección por afinidad diferencial puede comprender la subetapa adicional de liberar el antiligando del ligando.

Preferentemente, las etapas (ii) a (ix) de la etapa de selección por afinidad diferencial se llevaron a cabo en paralelo para aislar una pluralidad de antiligandos de una pluralidad de diferentes ligandos.

25 Las etapas (ii) a (ix) de la etapa de selección por afinidad diferencial se repitieron una o más veces.

Preferentemente, la cantidad en la etapa de selección por afinidad diferencial de una de la construcción del sustractor o la construcción diana se proporciona en exceso de la cantidad de la otra construcción del sustractor o de la construcción diana. El exceso de ligando puede estar entre 10 y 1000 veces, pero también puede estar entre 2 y
30 10 veces, o 1000 y 100.000 veces.

La magnitud del exceso de la población del ligando sustractor determina la mayor "resolución" posible (es decir, lo bien que será capaz de discriminar entre antiligandos con especificidad por ligandos que tienen una regulación por exceso baja, una regulación por exceso moderada, una regulación por exceso alta, o expresada de forma única) que el operario será capaz de detectar, y como será capaz de discriminar entre ligandos expresados de forma diferente.
35 Por ejemplo, Si se está utilizando una biblioteca con 100 antiligandos específicos de ligandos dianas y se añaden concentraciones suficientemente grandes de un ligando positivo de tal manera que todas las moléculas antiligandos se unirán al ligando en equilibrio, entonces, un exceso de población de ligando sustractor de 10 veces permitirá reducir la frecuencia de antiligandos con especificidad por los ligandos expresados comúnmente en un 90 %, mientras que un exceso de 200 veces (dos veces el número de aglutinantes específicos de antiligandos) permitiría eliminar los aglutinantes comunes (véase el documento WO 2004/023140, la figura 5 y la última parte del párrafo del ejemplo 4 para los datos que muestran esto).
40

En una opción, la ecuación de la etapa (iv) de la etapa de selección por afinidad diferencial es:
45

$$bA = \frac{(A + T + (K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxV))^2}{4} - AxT}$$

donde

bA = Antiligando unido

50

A = Número total de antiligandos

T = Número total de ligandos

C = Constante de Avogrado ($6,022 \times 10^{23}$ partículas/moles)

V = Volumen de reacción (litros)

55

K_d = Constante de disociación en equilibrio

Y en una opción alternativa la ecuación en la etapa (iv) de la etapa de selección por afinidad diferencial es:

$$bA = \left\{ \frac{(A + T + (K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxV))^2}{4} - AxT} \right\} \left\{ \frac{(T_p x C_p)}{((T_p x C_p) + (T_s x C_s))} \right\}$$

60

donde

bAp = Antiligando unido
 T_p = El número de ligandos en C_p
 T_s = El número de ligandos en C_s
 C_p = El número de construcciones de ligandos diana
 C_s = El número de construcciones de ligandos sustractores

A = Número total de antiligandos
 T = Número total de ligandos
 C = Constante de Avogrado (6,022 x 10²³ partículas/moles)
 V = Volumen de reacción (litros)
 K_d = Constante de disociación en equilibrio

Los medios de separación de la etapa de selección por afinidad diferencial pueden seleccionarse entre al menos uno de un soporte sólido, una membrana celular y/o partes de la misma, una membrana sintética, perlas, etiquetas químicas y ligandos libres. Los medios de separación de las construcciones del sustractor y diana pueden tener una densidad diferente. Los medios de separación de la construcción del sustractor pueden ser preferentemente una vesícula de membrana o una membrana celular completa.

La etapa (ix) del método de selección por afinidad diferencial puede llevarse a cabo mediante al menos uno de los métodos de separación que es uno de centrifugación en gradiente de densidad (Williams y Sharon, 2002), secuestro en soporte sólido, secuestro en perlas magnéticas (Siegel *et al.*, 1997), la unión a una etiqueta química y el reparto en fase acuosa.

El método de separación más preferente es la centrifugación en gradiente de densidad llevada a cabo en un gradiente de densidad, por ejemplo, Ficoll; Percoll; medios de gradiente yodados, en el que durante la centrifugación, el primer y el segundo ligandos diana se mueven a través del gradiente de Ficoll en diferentes extensiones por lo cual el primer y el segundo ligandos pueden aislarse de sus diferentes puntos finales.

De forma más preferente, el método de separación utiliza un gradiente de sacarosa-polímero, por ejemplo, Ficoll.

La biblioteca de la etapa (a) es preferentemente una biblioteca de expresión que comprende una pluralidad de miembros de la biblioteca que expresa antiligandos. Un ejemplo de dicha biblioteca es una biblioteca de expresión en fagos en la que el antiligando se expresa en la superficie de un bacteriófago.

La expresión de las proteínas y polipéptidos en la superficie del bacteriófago (fago), fusionada a una de las proteínas que revisten el fago, proporciona una potente herramienta para la selección de ligandos específicos. Esta técnica de 'expresión en fago' se usó originalmente por Smith en 1985 para crear grandes bibliotecas de anticuerpos con el fin de seleccionar aquellos con alta afinidad por un antígeno concreto. Más recientemente, el método se ha empleado en los péptidos actuales, dominios de proteínas y proteínas intactas en la superficie del fago a fin de identificar ligandos que tienen las propiedades deseadas.

Los principios detrás de la tecnología de expresión en fagos son de la siguiente forma:

- (i) Un ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido para la expresión se clona en un fago;
- (ii) El ácido nucleico clonado se expresa fusionado a la parte que se ancla al revestimiento de una de las proteínas de revestimiento del fago (normalmente, las proteínas de revestimiento p3 o p8 en el caso del fago filamentoso), de tal manera que la proteína o el polipéptido extraño se expresa sobre la superficie del fago;
- (iii) El fago que expresa la proteína o el polipéptido con las propiedades deseadas se selecciona a continuación (*por ejemplo*, mediante cromatografía de afinidad) proporcionando por tanto un genotipo (unido a un fenotipo) que se puede secuenciar, multiplicar y transferirse a otros sistemas de expresión.

Como alternativa, la proteína o el polipéptido extraño puede expresarse utilizando un vector de fagémido (*es decir*, un vector que comprende orígenes de replicación derivados de un fago y un plásmido) que puede envasarse como un ácido nucleico monocatenario en un revestimiento de bacteriófago. Cuando se emplean vectores de fagémidos, se usa un "fago auxiliar" para suministrar las funciones de replicación y empaquetado del ácido nucleico de fagémido. El fago resultante expresará la proteína de revestimiento natural (codificada por el fago auxiliar) y la proteína de revestimiento modificada (codificada por el fagémido), mientras que solo se expresa la proteína de revestimiento modificada cuando se usa un vector de fago.

El uso de la expresión en fagos para aislar ligandos que se unen a moléculas biológicamente relevantes se ha revisado en Felici *et al.* (1995), Katz (1997) y Hoogenboom *et al.* (1998). Se han construido algunas bibliotecas de péptidos combinatorias aleatorizadas para seleccionar los polipéptidos que se unen a diferentes dianas, *por ejemplo*,

receptores superficiales celulares o ADN (Kay y Paul, (1996).

5 Proteínas y proteínas multiméricas se han expresado satisfactoriamente en fagos como moléculas funcionales (véase Chiswell y McCafferty, (1992). Además, se han expresado fragmentos de anticuerpos funcionales (por ejemplo, Fab, Fv monocatenario [scFv]) (McCafferty *et al.* (1990); Barbas *et al.* (1991); Clackson *et al.* (1991)), y alguno de los inconvenientes de la tecnología de anticuerpos monoclonales han sido reemplazados debido a que se han aislado anticuerpos humanos de alta afinidad (Marks *et al.* (1991) y Hoogenboom y Winter (1992)).

10 Se proporciona información adicional de los principios y la práctica de la expresión en fagos en *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual* Ed Kay, Winter y McCafferty (1996).

15 Se puede construir la biblioteca de antiligandos a partir de al menos una seleccionada entre anticuerpos, y variantes de unión a antígenos, derivados o fragmentos de los mismos; moléculas que forman parte de estructuras principales con superficies variables diseñadas mediante ingeniería genética; receptores; y enzimas.

El ligando expresado diferencialmente puede ser al menos uno seleccionado entre antígenos; ligandos de receptores; y dianas enzimáticas que comprenden al menos uno entre hidratos de carbono; proteínas; péptidos; lípidos; polinucleótidos; moléculas inorgánicas y moléculas conjugadas.

20 El método divulgado en el presente documento puede comprender también una etapa adicional de exponer el ligando y sus medios de separación (procedentes de las etapas de selección por afinidad diferencial) a un estímulo que influya la expresión de los ligandos diana en dichas construcciones de ligandos.

25 Los antiligandos seleccionados identificados mediante el método divulgado en el presente documento pueden usarse posteriormente en la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en medicina para el tratamiento, obtención de imágenes, diagnóstico o pronóstico de la enfermedad. Los antiligandos basados en anticuerpos y, lo más importante, en anticuerpos humanos tienen gran potencial terapéutico.

30 Por lo tanto, se divulga también en el presente documento un método para preparar una composición farmacéutica que comprende, tras la identificación de un antiligando con características deseadas mediante un método e acuerdo con cualquier reivindicación anterior, añadir dicho antiligando a un transportador farmacéuticamente aceptable.

35 Se divulga también en el presente documento una composición farmacéutica preparada mediante el método del segundo aspecto para su uso en medicina. La composición farmacéutica puede utilizarse también en la fabricación de un medicamento para la prevención, el tratamiento, obtención de imágenes, diagnóstico o pronóstico de la enfermedad.

Definiciones

40 Por "selección por afinidad" los inventores entienden un método de selección de un miembro de una pareja de unión antiligando - ligando, basándose en su capacidad de unirse con alta afinidad al otro miembro.

45 Por "selección por afinidad diferencial" los inventores entienden un método de selección por afinidad para seleccionar un miembro de un paraje de antiligando - ligando que se expresa en diferentes cantidades en o en dos fuentes diferentes (por ejemplo, un sustractor/control y una diana), basándose en su capacidad de unirse con alta afinidad al otro miembro

50 Por "secuenciación de alto rendimiento" los inventores incluyen el significado que un gran número de secuencias se secuencian en paralelo (hasta millones) de tal manera que es prácticamente factible que la velocidad de secuenciación de un gran número de moléculas se realice de una manera significativamente más rápida y más barata.

55 Por "cribado confirmatorio", los inventores entienden la detección de una unión específica del ligando del combinado de antiligandos aislados y/o clones individuales antiligandos de una construcción diana frente a una construcción del sustractor utilizando cualquier ensayo que se dirija a la unión del ligando/antiligando, por ejemplo, Citometría de flujo, FMAT, ELISA, MSD y CBA. El término incluye además el significado de que una vez que se identifica el antiligando como la unión a un ligando expresado diferencialmente, se estudian la naturaleza e identidad del ligando y las interacciones de unión entre el antiligando y el ligando

60 Por "ligando", los inventores incluyen el significado de un miembro de una pareja de unión de un ligando/antiligando. El ligando puede ser, por ejemplo, una de las hebras de ácido nucleico en una pareja de unión complementaria de un duplete de ácido nucleico hibridado; una molécula efectora en una pareja de unión efector/receptor; o un antígeno en una pareja de unión antígeno/anticuerpo o una pareja de unión de un fragmento de antígeno/anticuerpo.

65 Por "antiligando", los inventores incluyen el significado del miembro opuesto de una pareja de unión de un ligando/antiligando. El antiligando puede ser la otra de las hebras de ácido nucleico de una pareja de unión de un

duplete de ácido nucleico complementario hibridado; la molécula receptora en una pareja de unión efector/receptor; o una molécula de anticuerpo o fragmento de anticuerpo en una pareja de unión a antígeno/anticuerpo o una pareja de unión de un antígeno/fragmento de anticuerpo, respectivamente.

5 Por "antígeno", los inventores incluyen el significado de una molécula o compuesto químico que es capaz de interactuar con anticuerpos pero que no produce necesariamente una respuesta inmunitaria. Dichos antígenos incluyen, aunque no de forma limitativa moléculas de proteínas, péptidos, nucleótidos, hidratos de carbono, lípidos o un conjugado de los mismos.

10 Por "ligandos expresados diferencialmente" los inventores entienden ligandos que se expresan a diferentes niveles entre las fuentes de la diana y el sustractor, incluyendo aquellos expresados solo en determinadas condiciones/lugares y no en otros; o cuando cualquiera del ligando diana o sustractor es una versión modificada de la otra de los ligandos diana o sustractor. Por ejemplo, algunos antígenos están muy expresados en las superficies celulares de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) y a bajos niveles o no en todos en las células sanas equivalentes (por ejemplo, células no cancerosas).

15 Por "ligandos de expresión baja" los inventores entienden aquellos ligandos que se expresan a bajos niveles, es decir, menos de 20.000 copias por célula, por ejemplo, entre 5.000 y 20.000 (esto incluye la mayoría de receptores superficiales celulares expresados de forma natural) o ligandos que se producen a una frecuencia de menos de un 1 % de cualquier otro, el ligando más altamente expresado en la muestra de población de ligandos positivos.

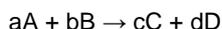
Por "construcción del ligando" los inventores entienden un sistema que comprende un ligando diana y/o un ligando sustractor asociado con medios de separación.

25 El término "variante de anticuerpo" debe tomarse para referirse a cualquier anticuerpo sintético, anticuerpo recombinante o híbridos de anticuerpos, tales como, aunque no de forma limitativa, una molécula de anticuerpo monocatenario producida mediante expresión in vivo de las regiones variables y/o las regiones constantes de la cadena ligera y/o pesada de la inmunoglobulina, u otra molécula inmunorreactiva capaz de unirse a un antígeno en un formato de inmunoensayo que es conocido por los expertos en la materia.

30 El término "derivado de anticuerpo" se refiere a cualquier molécula de anticuerpo modificada que sea capaz de unirse a un antígeno en un formato de inmunoensayo que es conocido por los expertos en la materia, tal como un fragmento de un anticuerpo (por ejemplo Fab o fragmento Fv), o una molécula de anticuerpo que está modificada por la adición de uno o más aminoácidos u otras moléculas para facilitar el acoplamiento de los anticuerpos a otro péptido o polipéptido, a una proteína transportadora grande o a un soporte sólido (por ejemplo, los aminoácidos tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y derivados de los mismos, grupos NH₂-acetilo o grupos amido en el extremo COOH, entre otros).

40 Por "centrifugación en gradiente de densidad" los inventores entienden la separación de elementos, por ejemplo, células, orgánulos y macromoléculas, de acuerdo con sus diferencias de densidad. Esta separación se consigue mediante centrifugación utilizando un gradiente de densidad de una solución adecuada, mediante el cual los elementos que se separan se mueven sobre la base de su densidad.

45 La "Ley de acción de masas" es una ley universal de la naturaleza que es aplicable bajo cualquier circunstancia. Esta ley indica que para la reacción:



50 y si este sistema está en equilibrio a una temperatura dada, entonces la siguiente relación es constante:

$$\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} = K_{eq}$$

donde:

55 A, B, C y D = son los participantes en la reacción (reactivos y productos)
a, b, c, y d = los coeficientes necesarios para obtener una ecuación química equilibrada

y en el que la constante se calcula en términos de concentración indicada por [] y K tiene unidades M^{c+d-(a+b)}.

60 Se describirán ahora ejemplos que abarcan determinados aspectos de la divulgación, con referencia a las siguientes figuras en las que:-

Figura 1 - Esquema del método de selección por afinidad diferencial descrito en (Fransson et al Int J

Canc 2006). Los números bajo las flechas indican el número de ab o clones de anticuerpos expresados en fagos que se retienen en el proceso de selección por afinidad tras cada una de las cinco etapas de cribado (1 a 5) y dos síntesis y etapas de verificación posteriores (6) y (7). Las etapas son: (1) Selección por afinidad diferencial, (2) Repicado de colonias de clones convertidos en scFv, (3) Expresión de clones scFv a nivel de un clon individual, (4) Cribado de clones scFv para la especificidad de los receptores superficiales expresados diferencialmente en células diana, (5) Secuenciación para la ID de secuencias únicas de Ab, (6) Síntesis de IgG, y (7) ensayo funcional *in vitro / in vivo*

Figura 2 - Cálculos informatizados que muestran que el combinado de anticuerpos derivados de selección por afinidad diferencial de linfocitos B cancerosos frente a linfocitos T de Jurkat ("BnonT") debe contener un número mucho mayor de anticuerpos contra varios receptores superficiales expresados diferencialmente que se identifican experimentalmente utilizando métodos convencionales

(1) Se indica que los cálculos se realizaron como se enseña en el documento WO2004/023140

Figura 3. El combinado de anticuerpo-fago derivado de la selección por afinidad diferencial de células DU-145 de cáncer de próstata frente a linfocitos T de Jurkat ("DnonT") es muy específico para la población de células diana (DU-145).

A) El gráfico muestra la unión específica dependiente de la dosis del combinado de fagos, obtenida tras dos ciclos de selección por afinidad diferencial, a las células DU145 diana, como se analizó mediante FACS. Señalar que no existe unión detectable a las células Jurkat no diana.

B) El gráfico muestra la unión específica de cada uno de los 1408 individuos, seleccionados de forma aleatoria, clones procedentes del combinado obtenido tras dos ciclos de selección por afinidad diferencial de células DU145 frente a células Jurkat, como se analizó mediante FMAT.

Figura 4. Las células DU-145 diana expresan varios receptores superficiales que se pueden clasificar como "expresados muy diferencialmente", "expresados diferencialmente a nivel intermedio", o "expresados diferencialmente a nivel bajo" basándose en su nivel de expresión absoluto de la célula diana y su nivel de expresión relativo sobre las superficies de células diana frente a células no diana.

Las células diana (DU145) y no diana (Jurkat) se cribaron para la expresión de tres antígenos; HER2, CD24 y CD130 mediante citometría de flujo anticuerpos marcados con Alexa Fluor 647.

A) La figura muestra la intensidad promedio de la fluorescencia de las células diana y no diana teñidas con anticuerpos marcados con zenon.

B) La figura muestra el porcentaje de células que expresan HER2, CD24 y CD130.

Figura 5. El análisis del gráfico de Scatchard desvela que los niveles de expresión de los receptores superficiales expresados diferencialmente dirigidos por anticuerpos aislados mediante selección por afinidad diferencial y secuenciación profunda varían entre 6.000 - 400.000 receptores por célula.

A. Curvas de saturación

B. Gráficos de Rosenthal. Se estimó que la afinidad (KD) del anticuerpo dirigido contra CD130 era de 0,8 nM y el número de receptores superficiales de CD130 era de 6.300/célula. Se estimó que la afinidad del anticuerpo dirigido contra CD24 era de 5,6 nM y el número de epítopos era de 8.400/célula. Se estimó que la afinidad del anticuerpo dirigido contra HER2 era de 47 nM y el número de epítopos era de 110.000/célula. Se llevó a cabo la evaluación con los gráficos de Rosenthal de la unión de los anticuerpos marcados con ¹²⁵I a las células DU145 estimuladas con INF gamma.

Figura 6. El combinado de anticuerpos derivado de la selección por afinidad diferencial de las células DU-145 de cáncer de próstata frente a linfocitos T de Jurkat ("DnonT") contiene clones de anticuerpos específicos de receptores superficiales muy expresados, expresados a nivel intermedio y expresados diferencialmente a nivel bajo.

Basándose en los análisis Scatchar y FACS (Figura 4 y 5), HER2, CD24, y CD130 se caracterizaron como receptores que se expresaban a niveles variables.

A) La figura muestra que los clones de anticuerpos específicos para todos los antígenos están presentes en el combinado de anticuerpos generado por dos ciclos de selección por afinidad diferencial de células DU-145 frente a células Jurkat como se analizó mediante ELISA.

B) La figura muestra que cuando los clones específicos de dianas en A se seleccionaron y volvieron a ensayar para la unión, la mayoría de los clones fueron aún positivos para el antígeno diana. La secuenciación de los clones de anticuerpos específicos de receptores superficiales diana recuperados demostró la

presencia de (al menos) 12 anticuerpos únicos en el combinado de anticuerpos seleccionados diferencialmente; ocho (8) anticuerpos dirigidos contra HER2, un (1) anticuerpo dirigido contra CD24 y tres (3) anticuerpos dirigidos contra CD130.

5 **Figura 7. La secuenciación de un número creciente de clones de anticuerpos seleccionados diferencialmente da como resultado la identificación de un número creciente de clones de anticuerpos específicos de receptores superficiales expresados diferencialmente en células diana expresadas a nivel bajo.**

10 Se determinaron las secuencias de clones de anticuerpos en tres combinados seleccionados aleatoriamente de aglutinantes de tamaño creciente (91 clones, 255 clones, y 813 clones, respectivamente). Posteriormente, se analizaron los clones que se encontraron en los tres combinados ("clones abundantes"), se encuentran solo en los dos combinados más grandes ("clones menos frecuentes"), o solo en el combinado más grande ("clones raros") para la unión de células DU145 mediante FACS y se compararon las intensidades promedio de fluorescencia, menos frecuente y clones raros.

15 Los datos demuestran claramente que los niveles promedio de expresión del receptor para clones abundantes > clones frecuentes intermedios > clones raros. Por tanto, la secuenciación de un número creciente de clones de anticuerpos seleccionados diferencialmente da como resultado la identificación de un número creciente de clones de anticuerpos específicos de receptores superficiales expresados diferencialmente en células diana expresadas a nivel *bajo*

20 **A)** La Figura muestra la intensidad promedio de fluorescencia de las células DU-145 teñidas con los respectivos clones de anticuerpos.

25 **B)** La Figura muestra el porcentaje de células diana que se unen a los clones de células individuales. Debido a que los clones se seleccionaron aleatoriamente, algunos de ellos fueron no aglutinantes y estos se eliminaron antes del análisis (un aglutinante se definió bien como un clon que proporciona una señal de al menos dos veces el control negativo en un porcentaje de células teñidas positivamente y la media geométrica, bien alternativamente, tres veces el valor superior de la media geométrica).

30 *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ como se calculó mediante ANOVA utilizando la corrección de Bonferroni para análisis múltiples.

Figura 8 - El esquema representa una comparación de las etapas de cribado del método de selección por afinidad diferencial anteriormente descrito (A., panel superior) y el nuevo método potenciado (B., panel inferior).

35 Los dos métodos difieren en varios aspectos; En primer lugar, en el método de cribado invertido se han omitido la conversión de scFv a Fago-ab, la expresión de scFv, y el cribado de scFv para las etapas de especificidad de la unión de la selección por afinidad diferencial del documento WO2004/023140. En segundo lugar, en el método de cribado invertido la selección por afinidad diferencial es seguida directamente por la secuenciación (profunda) mientras que en el proceso de cribado del documento WO2004/023140, la secuenciación de los clones de anticuerpos en el combinado está precedida por el cribado de clones scFv individuales para la especificidad del receptor superficial expresado diferencialmente de la célula diana. En tercer lugar, y lo más importante, el número de clones de anticuerpos (decenas de miles) y la calidad de los clones de anticuerpos (incluyendo la generación comprehensiva de anticuerpos específicos de receptores expresados diferencialmente de expresión baja) conseguido utilizando el proceso de cribado inverso puede no conseguirse prácticamente utilizando el método de selección por afinidad diferencial descrito anteriormente de A.

45 Las etapas son: (1) Selección por afinidad diferencial, (2) Repicado de colonias de clones convertidos en scFv, (3) Expresión de clones scFv a nivel de un clon individual, (4) Cribado de clones scFv para la especificidad de los receptores superficiales expresados diferencialmente en células diana, (5) Secuenciación para la ID de secuencias únicas de Ab, (6) Síntesis de IgG, (7) Ensayo funcional *in vitro* / *in vivo*, (2') Secuenciación en profundidad de siguiente generación, (3') Síntesis de la IgG de HT, (4') Cribado de clones de IgG para la especificidad de los receptores superficiales diferencialmente en células diana, (5') Ensayo funcional *in vitro* / *in vivo*

55 **Figura 9 - Cálculos mediante simulación informática del combinado de anticuerpo-fago recuperado derivado de dos ciclos de selección por afinidad diferencial de las células DU-145 de cáncer de próstata frente a los linfocitos T de Jurkat.**

60 **Ejemplo 1 - Combinar la selección por afinidad diferencial con la posterior secuenciación de alto rendimiento genera un número sin precedentes de clones de anticuerpos únicos específicos de receptores superficiales de células diana expresados diferencialmente**

Generación de un combinado de anticuerpos mediante selección por afinidad diferencial de linfocitos B cancerosos frente a linfocitos T de Jurkat ("BnonT")

65 En este experimento 2×10^{13} partículas de fagos de una biblioteca n-CoDeR muy diversificada que comprende algunos de los aglutinantes únicos de 10^{10} genotipos se mezclaron con células Ramos de la línea completa de

células de linfoma B (selección positiva), y las vesículas de membrana plasmática o membrana bruta o la línea Jurkat de leucemia de linfocitos T (selección negativa). Los aglutinantes específicos de antígenos que se expresan de forma única en la línea Ramos de células de linfoma B, que se compararon con la línea Jurkat de leucemia de linfocitos T, se van a aislar selectivamente.

5

Cálculo del número de células positivas y negativas para la selección

Las cantidades de células que se van a usar en los diferentes ciclos de selección se calcularon como se enseña en el (documento WO 2004/023140). Los parámetros de reacción utilizados para los cálculos fueron los mostrados en la Figura 2.

10

Las cantidades de células positivas y negativas se seleccionaron de tal manera que, tras tres ciclos de selección, los aglutinantes con especificidad por los antígenos expresados de forma única sobre linfocitos B quedarán enriquecidos 10.000 veces respecto a un antígeno expresado a igual densidad sobre linfocitos B y linfocitos T.

15

Se calculó el número de entrada de aglutinantes de fagos específicos de diferentes categorías de antígenos (antígeno expresado en células positivas enriquecidas, antígeno expresado en células únicas positivas, o antígeno expresado comúnmente en células positivas/negativas) en los ciclos de selección 2 y 3 multiplicando el número calculado de fagos eluidos, específicos de diferentes categorías de antígenos tras los ciclos de selección 1 y 2, con el factor de amplificación (AF).

20

Se obtuvo el factor de amplificación dividiendo el número total de fagos amplificados tras el ciclo de selección relevante con el número total de fagos eluidos procedentes del mismo ciclo de selección.

25

Métodos experimentales

Cultivos de células

La línea de linfocitos T de Jurkat, el clon E6-1 y la línea de células Ramos de linfoma B, se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 % (inactivado térmicamente solo para células Ramos), HEPES 10 mM y piruvato de sodio 1 mM, en una atmósfera humidificada a 37 °C. Se mantuvieron las células a $1-2 \times 10^6$ células/ml ($<1 \times 10^6$ células/ml para Jurkat).

30

Preparación de la membrana plasmática de linfocitos T de Jurkat

35

Cultivo de células Jurkat

Células E6-1 de Jurkat se mantuvieron en RPMI-1640 con Glutamax I (Gibco, n.º 61870-010) suplementado con suero de feto de ternero al 10 % (Gibco, Lote n.º 1128016) Piruvato de sodio 1 mM (Gibco) y tampón Hepes 10 mM (Gibco) en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % a 37°C, y a densidades celulares entre 1×10^5 a 1×10^6 células/ml. En el paso final, se dejó que las células alcanzaran una densidad máxima de 2×10^6 , momento en el cual se recogieron.

40

Rotura de células

45

1. Se recogieron las células del cultivo mediante centrifugación en tubos de centrífuga de 500 ml (Corning n.º 431123) colocados en adaptadores de tubos, 1500 rpm, 15 min a 4°C.

50

2. Se descartó el sobrenadante y se lavó en NaCl 0,145 M. Se combinaron las suspensiones de células, se contaron las células (un total de 5×10^9 células), y se repitió la centrifugación.

55

3. Se llevó a cabo la rotura de las células mediante choque hipoosmótico en NaHCO₃ 1 mM MgAc 1,5mM pH 7,4 en hielo durante 10-30 min y se produjo una posterior cavitación del nitrógeno en una prensa Yeda, 40 bar (4000 kPa) durante 15 min a 0°C. La concentración de células no excede de 5×10^7 células/ml.

60

4. Tras la rotura, se añadieron 150 µl de EDTA 0,5 M a la suspensión de homogenado para dar como resultado una concentración final de EDTA de 1 mM (la adición de EDTA evita la agregación de las vesículas de membrana).

5.

65

A) Aislamiento de membranas brutas: El homogenado (50 ml) se centrifugó durante 10 min a 1900 g (4000 rpm en un rotor SS34) para eliminar las células no rotas y los núcleos, y se recogió el sobrenadante. Se evitó el lavado y la recentrifugación del aglomerado, ya que los núcleos frágiles tienden a romperse, produciendo la escisión y agregación del ADN; o

B) Aislamiento de membranas plasmáticas: Se distribuyeron en capas 10 ml de sacarosa al 37,2 % en la parte inferior de un tubo de ultracentrifugación Beckman de 6x 38,5 ml, y 6x27 ml del homogenado celular de la etapa 2 anterior se distribuyeron cuidadosamente en capas en la parte superior. El tubo se centrifugó a 27000 rpm en un rotor oscilante SW28 (capacidad nominal de 6x39 ml) durante 2 h 45 min a 4 °C. Se aislaron las membranas plasmáticas de los tubos como la banda blanca de la interfase entre el cojín de sacarosa y la fase de la muestra y se agruparon los PM, se dividieron entre tubos de 4x 35 ml y se diluyeron en tampón TE (Tris 1 mM/sacarosa 0,25 M/tampón EDTA 0,25 M) hasta un volumen total de 35 ml.

6. Se llevó a cabo la ultracentrifugación en un rotor de tipo 45.Ti de Beckman (tubos Nalgene de una capacidad nominal de 6x 94 ml) a 40.000 rpm (aprox. 200.000 x g) durante 1 h a 4 °C.

7. Se descartaron los sobrenadantes y se eliminó cualquier tampón restante utilizando una pipeta Finn de 1 ml. Los aglomerados de membranas plasmáticas se eliminaron mediante rascado de los tubos con una barra metálica, y se transfirieron a un pequeño homogeneizador Dounce. Las membranas aglomeradas se volvieron a suspender mediante homogeneización en un volumen total de 2,5 ml de tampón TE que contenía Hepes 10 mM (Hepes 10 mM / Tris 1 mM /sacarosa 0,25 M / tampón EDTA 0,25 M) mediante 5-10 golpes con un pistón de vidrio Douce holgado. Aproximadamente, las membranas derivadas de algunas de las 2×10^9 células Jurkat se pueden volver a suspender por ml de tampón de resuspensión (TE).

Determinación de la concentración de proteínas

Se llevó a cabo la determinación de la concentración de proteínas utilizando el kit BCA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se preparó un doble patrón de BSA mediante diluciones de 2 veces (muestra de 10 μ l + 10 μ l de tampón) en PBS de una solución madre de 2 mg/ml de BSA. Se generó una curva patrón y se utilizó para determinar la concentración total de proteína de las muestras de membrana.

Actividad de la membrana plasmática (mediante el ensayo de la fosfatasa alcalina)

Soluciones de fosfatasa alcalina

Solución de sustrato:

1 comprimido de p-NPP por 10 ml de tampón borato (concentración final de 1,5 mg/ml) en tampón borato de sodio 50 mM (pH 9,8), $MgCl_2$ 1,0 mM

Se diluyeron muestras por triplicado en tampón borato/ $MgCl_2$ transfiriendo 50 μ l de muestra a 50 μ l de tampón de dilución (tampón borato de sodio 50 mM (pH 9,8), $MgCl_2$ 1,0 mM. 200 μ l de solución sustrato (1 comprimido de p-NPP por 10 ml de tampón borato hasta una concentración final de 1,5 mg/ml en tampón borato de sodio 50 mM, pH 9,8, $MgCl_2$ 1,0 mM) se añadieron a dos de tres muestras para cada dilución. A continuación se incubaron las muestras a 37°C durante 60 minutos más. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 410 nm, y los valores del(de los) pocillo(s) control adecuado(s) (por ejemplo, el homogenado total de células cavitado con nitrógeno, excluyéndose los núcleos y las mitocondrias pesadas) cuando no se añadió sustrato se sustrajeron. Los resultados se representaron gráficamente y se analizaron.

Procedimiento de selección: Protocolo de selección por afinidad diferencial

Parámetros de reacción

1^{er} ciclo de selección

una solución madre de fagos n-CoDeR Lib2000 que comprendía 10^{10} genotipos de partículas de fagémidos únicas (Amp^r) se amplificó hasta un total de 2×10^{13} ufp en 1,6 ml de leche-PBS al 2 % (con Ca y Mg).

Volumen total de reacción 2,5 ml

Positivo - 5×10^7 células Ramos de linfoma de linfocitos B

Negativo - membranas brutas de linfocitos T de Jurkat derivadas de 2×10^9 células

2^o ciclo de selección

$1,5 \times 10^{12}$ fagos eluidos a partir del ciclo de selección previo se amplificaron a continuación, se precipitaron y se volvieron a suspender en 100 μ l de leche-PBS al 2 % (con Ca y Mg).

Volumen total de reacción 0,5 ml

Positivo - 5×10^6 células Ramos de linfoma de linfocitos B

Negativo - vesículas de membranas brutas de linfocitos T de Jurkat T derivadas de 1×10^9 células

3^{er} ciclo de selección

1×10^{12} fagos eluidos y amplificados de la ronda de selección anterior resuspendidos en 100 μ l de 2 % de leche-PBS (con Ca y Mg).

Volumen total de reacción 0,5 ml

Positivo - 5×10^6 células Ramos de linfoma de linfocitos B

Negativo - vesículas de membranas plasmáticas de linfocitos T de Jurkat derivadas de 1×10^9 células

5 Método

La solución madre de fagos se precalentó a 37°C durante 15 min y se sometió a vortización de forma intermitente. La solución madre de fagos se centrifugó durante 15 min a toda velocidad en una centrifuga eppendorf. Cuando se hubo formado un precipitado, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se volvió a suspender en leche desnatada hasta una concentración final del 2 %.

Preparaciones de membranas plasmáticas de células Jurkat del control de 2×10^9 células (ciclos 2 y 3 de selección por afinidad de 1×10^9 células) se descongelaron en hielo. (se guardaron también 10 µl para la determinación de la concentración de proteínas.) Las preparaciones de membranas plasmáticas descongeladas se volvieron a suspender añadiendo solución madre de fagos y mezclando con una pipeta y posteriormente se incubaron durante 15 minutos en hielo.

5×10^7 (ciclos 2 y 3 de selección por afinidad de 5×10^6 células) células Ramos se centrifugaron a 1200 rpm, 6 min, 4°C.

Se descartó el sobrenadante y se volvieron a suspender las células Ramos en solución madre de membranas celulares negativas a fagos en leche y se incubaron a 10 °C y sometieron a rotación lenta (de punta a punta) durante 4 horas.

La célula / membrana celular / fago incubados se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml que contenía 1 ml de Ficoll al 100 % (teñido con azul tripán) en la parte inferior, y se superpusieron 9 ml de Ficoll-Paque Plus al 40 % en BSA/PBS al 2 % (con Ca y Mg). El tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, 4°C, se hizo rotar 180° y se centrifugó durante 1 minuto más a fin de desalojar las células de la pared del tubo.

La interfase que contenía células Ramos completas y fagos unidos se aspiró cuidadosamente utilizando una jeringuilla y una aguja de calibre mayor (e.g. Microlance 3 - 19GA11/2 1,1x40 TW PM). La aguja se insertó exactamente por debajo de la interfase que contenía las células con el extremo biselado hacia arriba. Se recogió la capa de células (aproximadamente 150 µl) y la aguja se empujó a través del plástico del tubo, opuesto al orificio de entrada. Los contenidos de la jeringuilla se expelieron en el tubo nuevo, y se lavaron dos veces absorbiendo el PBS reciente en la aguja situado todavía como perforación del tubo). La suspensión celular recogida se volvió a suspender en 500 µl de PBS-BSA al 2 % y se lavó repetidamente, guardando el sobrenadante para la valoración.

Las células se volvieron a suspender en 1 ml de PBS y se transfirieron a un tubo Eppendorf nuevo de 15 ml en el que se centrifugaron a 1260 rpm durante 10 min, 4°C. El sobrenadante se retiró usando una pipeta, guardando el sobrenadante para la valoración.

Los fagos se eluyeron de las células mediante la adición de 150 µl de ácido cítrico 76 mM (pH 2,5) en PBS seguido por incubación a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se neutralizó mediante la adición de 200 µl de Tris-HCl 1M, pH 7,4. A continuación se centrifugaron las células y se guardaron los fagos eluidos.

Se volvieron a suspender las células en 1 ml de tripsina y se transfirieron a un nuevo tubo y se incubaron durante 10 min antes de la inactivación con 40 µl 1mg/ml de aprotinina. Se centrifugaron las células, guardando el sobrenadante para la valoración.

50 Amplificación en placas grandes tras los ciclos 1 y 2 de selección

1. Se empezó con 10 ml de cultivos HB101F' de *E.coli* (uno para cada selección que se va a amplificar + uno para la medición de la DO₆₀₀) 2,5-3 h antes de usar mediante la adición de 50 µl de cultivo durante la noche a 10 ml de LB (caldo lisogénico) que contenía 15 µg/ml de Tetraciclina. Se comprobó la DO en un cultivo tras aproximadamente 2,5 h.

2. Los tubos se infectaron con la mitad de los fagos eluidos a una DO₆₀₀ = 0,5.

3. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 50 rpm, y para la fenotipación adecuada 30 min más a 37°C, 200 rpm.

4. Se concentraron las bacterias (10 ml) mediante centrifugación durante 10 minutos a 2060xg (3000 rpm Beckman GS-6).

5. Las bacterias se volvieron a suspender en parte del sobrenadante (aproximadamente 3 ml) y se pulverizaron en placas grandes de 500 cm² LA (agar luria) que contenían 100 µg/ml de ampicilina+15 µg/ml de tetraciclina+1

% de glucosa.

6. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C.

5 7. Se recogieron las bacterias de las placas mediante la adición de 5 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 15 µg/ml de tetraciclina y rascando. Las placas se inclinaron y se aspiró la solución.

10 8. Se lavaron las placas con 3 ml más de medio LB como anteriormente y se vertieron con la primera suspensión bacteriana en tubos Falcon de 50 ml.

15 9. Se concentraron las bacterias mediante centrifugación durante 10 minutos a 2100xg /3000 rpm, Beckman GS6 a temperatura ambiente en 1 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 15 µg/ml de tetraciclina.

20 10. se añadieron 500 µl de glicerol al 50 % a 1 ml de suspensión bacteriana y se congeló la solución madre de glicerol a -80°C.

25 11. 2 x10 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 15 µg/ml de tetraciclina se infectaron con 2,5 µl (5 µl) de la solución madre de la etapa 10, y se hicieron crecer hasta una DO₆₀₀=0,5.

30 12. 6x10⁹ UFP de fago auxiliar R408 se añadieron por ml de cultivo y los cultivos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 50 rpm.

35 13. Se añadió solución IPTG a una concentración final de 100 µM (es decir 2 µl de una solución madre 0,5 M por 10 ml de cultivo) y los cultivos se incubaron durante la noche a 25°C y 175 rpm.

Recogida y precipitación de soluciones de fagos amplificadas

40 1. Se aglomeraron las bacterias durante 10 minutos a temperatura ambiente. 2100xg (3000 rpm, en Beckman GS-6) y el sobrenadante estéril se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 µm.

45 2. Se combinaron tubos que procedían de la misma selección y los fagos precipitaron mediante la adición de ¼ de volumen de tampón de precipitación de fagos e incubación durante al menos 4 horas a 4°C.

50 3. Se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a 4°C y 13000xg.

55 4. El aglomerado se volvió a suspender completamente en 100 µl de PBS durante la noche a 4°C.

Amplificación en placas para soluciones madre de glicerol, y cultivo durante la noche de minipreps (tras el ciclo 3 de selección).

60 1. Se empezó con 10 ml de cultivos HB101F' de *E.coli* (uno para cada selección que se va a amplificar + uno para la medición de la DO₆₀₀) 2,5-3 h antes de usar mediante la adición de 50 µl de cultivo durante la noche a 10 ml de LB que contenía 15 µg/ml de Tetraciclina. Se comprobó la DO en un cultivo tras aproximadamente 2,5 h.

65 2. Los tubos se infectaron con la mitad de los fagos eluidos a una DO₆₀₀ = 0,5.

70 3. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 50 rpm, y para la fenotipación adecuada 30 min más a 37°C, 200 rpm.

75 4. 10 ml de medio LB caliente que contenía 200 µg/ml de ampicilina se añadieron y las bacterias infectadas se dividieron en 2 partes de 10 ml cada una.

80 5. En uno de los dos tubos, se concentraron las bacterias (10 ml) mediante centrifugación durante 10 minutos a 2100xg /3000 rpm, Beckman GS-6 a temperatura ambiente, se volvieron a suspender en un volumen pequeño y se pulverizaron en una placa de 500 cm² de LA (100 µg/ml ampicilina+15 µg/ml de tetraciclina+1 % de glucosa) y se incubaron durante la noche a 30°C.

85 6. Miniprep: Los otros 10 ml se centrifugaron y volvieron a suspender en 6 ml de LB que contenía 0,1 % de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 30°C, 175 rpm.

90 7. Se recogieron las bacterias de las placas mediante la adición de 5 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 15 µg/ml de tetraciclina y rascando. Las placas se inclinaron y se aspiró la solución.

95 8. Se lavaron las placas con 3 ml más de medio LB como anteriormente y se vertieron con la primera suspensión bacteriana en tubos Falcon de 50 ml.

9. Se concentraron las bacterias mediante centrifugación durante 10 minutos a 2100xg /3000 rpm, Beckman GS6 a temperatura ambiente en 1 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 15 µg/ml de tetraciclina.

5 10. se añadieron 500 µl de glicerol al 50 % a 1 ml de suspensión bacteriana y se congeló la solución madre de glicerol a -80°C.

11. Se obtuvo ADN de anticuerpo procedente de fagos purificados preparando minipreps de 3 ml de cultivo de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit (BioRad).

10 Para evaluar directamente la diversidad de anticuerpos en el combinado generado mediante selección por afinidad diferencial BnonT, los inventores utilizaron tecnología 4-5-4 (Margulies et al., 2005) y se estimó la diversidad de anticuerpos determinando el número de variantes de CDRH3 únicas en el combinado de anticuerpos seleccionados diferencialmente.

15 Se llevó a cabo la secuenciación profunda mediante tecnología 4-5-4 en ADN de anticuerpo procedente de fagos purificados obtenido tras tres ciclos de selección por afinidad diferencial ("B nonT"), identificando un total de 22.497 secuencias únicas (Tabla 2). A fines comparativos, el cribado convencional con secuenciación de Sanger de ADN de anticuerpo procedente de fago de las mismas selecciones por afinidad diferencial BnonT identificó solo ocho clones de anticuerpos únicos (Tabla 1).

20

Tabla 2. La secuenciación profunda de siguiente generación desvela diversas secuencias de anticuerpos sorprendentemente grande en el combinado de anticuerpos generado mediante selección por afinidad diferencial de células diana frente a células no diana.

Réplicas por secuencia	N.º de secuencias únicas identificadas	
	"BnonT"	"DnonT"
>1	22497	68060
>1	5353	25141
>5	1589	6904
>10	996	4107
>20	593	2344
>30	419	1638
>40	318	1274
>50	258	1058
>100	136	517
>200	52	225

25 Esta observación junto con el hallazgo de los inventores notificado anteriormente (Fransson et al., 2006) de que la gran mayoría (<99 %) de clones BnonT seleccionados directamente eran específicas de los receptores superficiales expresados diferencialmente en linfocitos B cancerosos demuestra que

- 30 a) el combinado de anticuerpos seleccionado diferencialmente estaba, de hecho, muy diversificado, y
 b) que combinando la selección por afinidad diferencial y la secuenciación de alto rendimiento, el número de clones de anticuerpo únicos específicos de receptores superficiales expresados diferencialmente que se pueden identificar es de órdenes de magnitud mayores que los alcanzados mediante estrategias de cribado convencionales.

35 A fin de demostrar que la selección por afinidad diferencial seguida por la secuenciación de alto rendimiento puede utilizarse de forma reproducible para generar grandes cantidades de anticuerpos específicos de diversos receptores superficiales expresados diferencialmente por diversos tipos de células diana, se llevó a cabo una nueva reacción de selección por afinidad diferencial/secuenciación profunda - utilizando esta vez células DU-145 de cáncer de próstata como células diana y linfocitos T como células no diana en la reacción de purificación por adsorción "DnonT".

40

De nuevo, la selección por afinidad diferencial generó un combinado específico de anticuerpo altamente específico de células diana (Figura 3). Se llevó a cabo la secuenciación profunda mediante tecnología 4-5-4 en ADN de anticuerpo procedente de fagos purificados obtenido tras dos ciclos (DU-145 frente a T) de selección por afinidad diferencial ("B nonT"), identificando un total de 68.060 secuencias únicas respectivamente (Tabla 2).

45

La gran mayoría de estas secuencias de anticuerpos es probable que sean específicas de los antígenos expresados diferencialmente en células dianas, como se indicó mediante el cribado de >1400 clones de anticuerpos repicados aleatoriamente para la unión de células DU-145 frente a linfocitos T (Figura 3B) y mediante cálculos mediante simulación informática (Figura 9).

Los inventores concluyen que la a) aplicación combinada de selección por afinidad diferencial en una biblioteca de anticuerpos humanos muy diversificada seguido por b) secuenciación profunda del combinado de anticuerpos generado mediante selección por afinidad diferencial, genera de forma reproducible un número mucho mayor de clones de anticuerpos específicos de los receptores superficiales expresados diferencialmente en células diana que lo que es posible mediante estrategias de cribado convencionales.

Ejemplo 2 - Combinar la selección por afinidad diferencial con la secuenciación de alto rendimiento posterior genera un combinado cualitativamente único de clones de anticuerpos - incluyendo aquellos específicos de los receptores superficiales expresados diferencialmente que se expresan a nivel bajo

Se llevaron a cabo cálculos mediante simulación informática como se describe en (documento WO2004/023140 y Frendéus, (2006), aplicando la Ley de acción de masas, que enseña que cuando se aplica una selección por afinidad diferencial como se lleva a cabo en la actual solicitud (como se ilustró en el Ejemplo 1 utilizando linfocitos B cancerosos o células de cáncer de próstata como dianas), la frecuencia de clones de anticuerpos recuperados en el combinado de anticuerpos seleccionado será una función directa de a) sus receptores de expresión absoluta y relativa dirigidos sobre las superficies de la célula diana frente a la célula no diana y b) sus respectivas afinidades por los receptores superficiales dirigidos.

Estos cálculos identifican además que, al contrario que la visión común prevaleciente (Hoogenboom, 2002) (Liu et al., 2004; Mutuberría et al., 1999; Osbourn et al., 1998) los clones de anticuerpos específicos para los receptores superficiales expresados a nivel bajo (por ejemplo, menos de 20.000 por célula) así como los receptores superficiales específicos expresados a nivel intermedio (por ejemplo, expresados a 20.000-50.000 receptores por célula) pueden, y se seleccionarán mediante selección por afinidad diferencial como se describe en el presente documento, y estarán presentes en el combinado de anticuerpos eluido aunque a una frecuencia drásticamente inferior en comparación con los clones de anticuerpo específicos para los receptores superficiales expresados diferencialmente que se expresan a nivel alto (Figura 2 y 9).

Se han utilizado ahora algunas estrategias para demostrar que el combinado de anticuerpos generado mediante selección por afinidad diferencial y secuenciación profunda es único ya que contiene clones de anticuerpos específicos de los receptores superficiales expresados diferencialmente a niveles bajo e intermedio, y que el *incremento* de la profundidad de secuenciación (es decir, el número de secuencias de clones de anticuerpos analizadas) da como resultado la identificación de anticuerpos específicos para los receptores superficiales expresados diferencialmente a niveles *decrecientes* (inferiores) sobre las células diana (frente a las no diana).

En primer lugar, los inventores demostraron que el combinado de anticuerpos seleccionado mediante selección por afinidad diferencial contiene clones de anticuerpos que son específicos de los receptores superficiales expresados diferencialmente a niveles bajo e intermedio (Figuras 4, 5 y 6).

Sometiendo el combinado de anticuerpos seleccionado diferencialmente a una selección adicional con dominios extracelulares (DEC) de receptores superficiales verificados para expresarse diferencialmente por células diana frente a células no diana, y verificados para expresarse a niveles bajo a intermedio sobre células diana mediante el gráfico de Scatchard y los análisis FACS (Figura. 4 y 5 TBG) los inventores aislaron varios (doce) clones de anticuerpos específicos de diferentes receptores superficiales expresados a niveles bajo e intermedio a partir de un combinado de anticuerpos expresado diferencialmente incluyendo aquellos específicos de los receptores superficiales de CD24, CD130 y HER2 (Figura 6).

Se convirtió un anticuerpo aislado contra cada receptor a un formato IgG y se utilizó para los análisis Scatchard y FACS, desvelando los niveles de expresión de 6.000 - 100.000 receptores/célula (Tabla 3, Figura 4 y 5).

Tabla 3. El análisis Scatchard de células DU145 con anticuerpos contra tres receptores superficiales desvela los niveles de expresión de 6.000 - 100.000 receptores/célula.

Receptor	Anticuerpo KD (nM)	Epítipo/célula
CD130	0,8	6.300
CD24	5,6	8.400
HER-2	47	110.000

Métodos experimentales

Selección con dominios extracelulares (DEC) de receptores superficiales

5 Parámetros de reacción

Los fagos eluidos y amplificados tras dos ciclos de selección por afinidad diferencial DU-145 frente a T, "DnonT") se precipitaron y se volvieron a suspender en PBS. 100 µl (que correspondía a $2,4 \times 10^{11}$ fagos) se utilizaron en el 3^{er} ciclo de selección.

10 Volumen total de reacción 1,0 ml

En la selección, los fagos se enriquecieron con aglutinantes de tres proteínas localizadas en la superficie: CD24, CD130 y HER2.

15 Método - selecciones de DEC

Se utilizaron 50 pmoles de cada proteína (véase anteriormente) para revestir 4 esferas de poliestireno (Polysciences, n.º de cat 17175-100) en un volumen de reacción de 1 ml de tampón carbonato de sodio 0,1 M, pH 9,5. Se llevó a cabo el revestimiento en un tubo eppendorf a temperatura ambiente durante 1 h con una rotación de punta a punta y una etapa de incubación durante la noche posterior a 4°C sin rotación.

20 Las esferas revestidas se lavaron una vez con 1 ml de TPBSB-3 % (PBS que contenía BSA al 3 %, Tween-20 al 0,05 % y NaN_3 al 0,02 %), y se bloquearon mediante una etapa de incubación de 1 h con 1 ml de TPBSB-5 % (PBS que contenía BSA al 5 %, Tween-20 al 0,05 % y NaN_3 al 0,02 %) a temperatura ambiente durante 1 h con una rotación de punta a punta. Tras lavar con 1 ml de TPBSB-3 %, las esferas se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo y se añadieron los fagos a las esferas bloqueadas (en un volumen total de 1 ml de TPBSB-3 %). La mezcla se incubó durante la noche a 4°C con rotación de punta a punta.

30 Para eliminar los fagos no unidos, las esferas se lavaron tres veces con 1 ml de TPBSB-3 %, seguido por tres lavados con 10 ml de TPBS (PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %, y NaN_3 al 0,02 %) y tres lavados con 10 ml de PBS. Antes del lavado con TPBS, las esferas se recogieron usando un filtro y se transfirieron a un tubo nuevo de 50 ml, en el que se llevaron a cabo todas las etapas de lavado posteriores. Para facilitar el procedimiento de lavado, cada etapa de lavado fue seguida por una etapa de incubación de tres minutos a temperatura ambiente con rotación de punta a punta.

35 Se recogieron las esferas lavadas usando un filtro y se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo. Los fagos unidos se eluyeron incubando las esferas con 400 µl de tripsina al 0,5 % a temperatura ambiente durante 30 minutos con una rotación de punta a punta, seguido por la adición de 40 µl de aprotinina (2 mg/ml) para inactivar la tripsina. La mezcla de tripsina/aprotinina que contenía los fagos eluidos se transfirió a un tubo eppendorf y las esferas se lavaron con 200 µl de PBS, que se combinaron posteriormente con los fagos eluidos, dando como resultado un volumen total de 640 µl.

Amplificación en placas para soluciones madre de glicerol, y cultivo durante la noche de minipreps

45 Estos aspectos del método se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

Conversión del fago unido al formato scFv soluble

50 Este es un método de conversión donde el fragmento scFv está restringido a partir del fagémido (Amp^R) y se inserta en un vector, pKscFv-3x FH , que transporta un gen que codifica la resistencia a la kanamicina.

Material:

55 *AvrII* (4 U/µl, New England Biolabs N.º de Cat R0174)

10xNEBuffer2 (New England Biolabs N.º de Cat B7002S)

Agua MQ

60 *SfiI* (20 U/µl, New England Biolabs N.º de Cat R0123)

10xBSA (100x BSA New England Biolabs N.º de Cat B9001S diluido 10x en agua MQ)

Kit de purificación de la PCR QIAquick (Qiagen N.º de Cat 28104)

65 pKscFv 3x FH digerido con *SfiI*/*AvrII*

ES 2 690 783 T3

ADN Ligasa de T4 (1 U/μl, Invitrogen N.º de Cat 15224-017)

5x tampón ADN ligasa de T4 (Invitrogen, N.º de Cat P/N Y90001)

5 Digestión de ADN de fagémido

- Prepare las reacciones de digestión usando las minipreps de fagémidos:

2 μg	Miniprep de fagémidos
1 μl ⇒ 4U	<i>AvrII</i>
2 μl ⇒ 1x	10xNEBuffer2
MQ H ₂ O hasta un volumen total de 20 μl	

- 10
- Incube a 37°C durante 2 horas.
 - Continúe con la digestión de *SfiI*. Añada a la mezcla de digestión de lo anterior:

1 μl ⇒ 1x	10xNEBuffer2
3 μl ⇒ 1x	10xBSA
1 μl ⇒ 20U	<i>SfiI</i>
5 μl	H ₂ O MQ ⇒ volumen total 30 μl

- Incube a 50°C durante 2 horas.

- 15
- Purifique el ADN digerido utilizando el Kit de purificación de la PCR QIAquick. Utilice 50 μl de agua para elución. Se recuperarán aproximadamente 50 μl con una concentración total de 40 ng/μl (suponiendo una recuperación del 100 %).

20 Ligadura

- Configure la siguiente mezcla de ligadura:

0,6 μl ⇒ 60 ng	pKscFv 3x β gal digerido con <i>SfiI/AvrII</i>
6 μl ⇒ 240 ng	miniprep de fagémido purificado/digerido con <i>SfiI/AvrII</i>
5 μl ⇒ 1x	5x tampón ligasa
1 μl ⇒ 1U	ADN Ligasa de T4
12,4 μl	H ₂ O MQ ⇒ volumen total de 25 μl

- 25
- Incube a 16°C durante la noche.
 - Almacene a -20°C hasta su uso.

Transformación

- 30
- El ligado producido anteriormente se transformó en *E. coli*/TOP10.

Un tubo (100 μl/tubo) / ligado de células TOP10 químicamente competentes se descongelaron en hielo. Se añadieron 10 ng de ligado por tubo y se incubaron los tubos en hielo durante 30 min.

- 35
- A continuación se incubaron los tubos a 42°C (baño de agua) durante 90 s, y se incubaron adicionalmente en hielo durante 5 min.

Se añadieron 900 μl de LB a cada tubo y se incubaron los tubos a 37°C, 1 h, 200 rpm.

- 40
- El contenido de cada tubo se diseminó en una placa LA de 500 cm² (100 μg/ml Kanamicina+1 % de glucosa) y se incubó durante la noche a 37°C.

Repicado de colonias

- 45
- Se repicaron un total de 1152 clones de cada selección (CD24, CD130 y HER2) de las placas LA grandes a 3 placas de microvaloración x 384 pocillos/selección (una totalidad de 9 placas) utilizando un sistema de repicado de colonias "Q-bot" de Genetix.

- 50
1. Mezcle el medio LB, 20 μg/ml de Kanamicina y glucosa al 1 %.
 2. Rellene las placas (Greiner Flat 384 pocillos 781101) con medio, 60 μl/pocillo.
 3. Repique las colonias co Q-Bot de acuerdo con el protocolo.

Expresión de clones en un formato de 384 pocillos

1. Rellene la placa de expresión (Greiner Flat 384 pocillos 781101) con 50 µl/pocillo de medio incluyendo 20µg/ml de Kanamicina.
- 5 2. Inocule la placa de expresión con 5 µl/pocillo procedentes de la placa maestra.
3. Incube la placa de expresión a 37 °C, 600 rpm durante 3,5 h.
4. Induzca la producción de scFv con 10 µl/ pocillo de medio incluyendo 20µg/ml de Kanamicina y 2,5 mM de IPTG.
- 10 5. Incube la placa de expresión durante 10 h a 37 °C, 600 rpm.
6. Almacene la placa de expresión a +4°C.

Cribado de clones de 384 pocillos

Material:

- 15 CD24-GST (0.11mg/ml), Abnova N.º de Cat H00000943-H01
- HER-2-Fc (0.1mg/ml in PBS), R&D Systems N.º de Cat 1129-ER
- CD130 (0.2mg/ml), R&D Systems N.º de Cat 228-GP
- 20 IgG humana (6,2 mg/ml), Sigma N.º de Cat I2511
- Anti His-HRP, R&D Systems N.º de Cat MAB050H
- Anti FLAG-AP, Sigma N.º de Cat A9469
- Gelatina de pescado, Sigma N.º de Cat G7765
- Supersignal ELISA Pico, Thermo Scientific N.º de Cat 37069
- 25 Tropix CDP Star Emerald II, Applied Biosystems N.º de Cat T2388C

Procedimiento:

Día 1 Revestimiento

- 30 1. Revista las placas (Placa Greiner de 384 pocillos de color blanco HB 781074) con:
 - CD24 0,4 pmoles/pocillo
 - HER2 0,8 pmoles/pocillo
 - 35 CD130 0,9 pmoles/pocillo
 - hlgG (no diana) 1 pmol/pocillo
 diluido en Carbonato de sodio 0,1 M, pH 9,5, 50 µl/pocillo. Incube las placas durante la noche a +4°C.

Día 2

- 40 2. Lave las placas con 1xPBS, 0,05 % (v/v) Tween-20 tres veces.
3. Añada PBS+Tween-20 al 0,05 %+0,45 % de gelatina de pescado, 40 µl/pocillo.
4. Añada el scFv expresado, 10 µl/pocillo e incube la placa a temperatura ambiente durante 1 hora.
5. Lave las placas como anteriormente.
- 45 6. Añada el anticuerpo secundario diluido en PBS+Tween-20 al 0,05 % +0,45 % de gelatina de pescado; α-HIS-HRP diluido 1:4000 a placas revestidas con CD24, CD130 y hlgG, α-FLAG-AP, diluido 1:25000 a placas revestidas con HER2 y hlgG, 50 µl/pocillo e incube la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Nota: Duplique las placas para hlgG.
7. Lave las placas como anteriormente. Lave las placas con Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9,8 tres veces.
8. Añada sustrato;
- 50 A placas con anticuerpo dirigido contra His-HRP añada Pierce Supersignal ELISA Pico diluido 1:20 en Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9,8, 50 µl/pocillo e incube la placa durante 10 min a temperatura ambiente.
- A placas con anticuerpo dirigido a Flag añada Tropix CDP Star Emerald II diluido 1:20 en Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9,8, 50 µl/pocillo e incube la placa durante 30 min a temperatura ambiente.
9. Lea las placas.

Análisis FACS de expresión del receptor de DU145 tras la estimulación con IFN-γ

Material

- 60 Células Jurkat
- Células DU145
- Tripsina-EDTA (Invitrogen N.º de Cat 25300-054)
- rh-IFN-γ (R&D Systems N.º de Cat 285-IF)
- IgG bloqueada de (Jackson Immunoresearch N.º de Cat 015-000-002)
- 65 tampón FACS (Gibco N.º de Cat 14040 PBS con/sin Ca y Mg + BSA al 0,5 %)
- Kit de marcado de la IgG humana conjugada con Zenon Alexa Fluor 647 (Invitrogen N.º de Cat Z25408)

Estimulación con INF-γ

Se estimularon células DU145 con 250IE INF-γ durante 24h. Se recogieron las células con tampón de disociación de células.

5

Método del citómetro de flujo

Las células se lavaron una vez en tampón FACS y se llevó a cabo el bloqueo utilizando 50 µg/ml de IgG de ratón en tampón FACS en hielo durante 10 minutos. Mientras tanto, los anticuerpos se marcaron con Zenon AF 647 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

50 µl de suspensión celular (aprox 500.000 células) se transfirieron a los tubos FACS y se añadieron 50 µl de anticuerpo marcado antes de la incubación durante 1 h en hielo.

A continuación se usó tampón FACS para lavar las células y la suspensión resultante se analizó en un citómetro de flujo (BD Bioscience, FACS Calibur).

15

Análisis scatchard de la expresión del receptor de DU145 tras la estimulación con IFN-γ

Estimulación con INF-γ

20

Se estimularon células DU145 con 250IE INF-γ durante 24h. Se recogieron las células con tampón de disociación de células.

Análisis Scatchard

25

Se marcaron los anticuerpos con ¹²⁵I utilizando yodo libre y los tubos de ensayo se prerrevistieron con el reactivo oxidante Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3α,6α-difenilglicoluri, Thermo scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, 200 µg de anticuerpo se marcaron durante 10 minutos en PBS y se eliminó el yodo libre utilizando una pequeña columna de desalación desechable (NAP 5, GE Healthcare Life science). El anticuerpo marcado tuvo una actividad específica de aproximadamente 2,5 µCi/µg de anticuerpo y contenía menos de un 1 % de yodo libre como se estimó con la cromatografía en papel.

30

0,5x10⁶ células se incubaron durante 2,5 h (en un baño de hielo) con diferentes concentraciones de anticuerpo marcado con ¹²⁵I. El anticuerpo no unido libre (F) se separó del anticuerpo unido a célula mediante centrifugación a través de un cojín de Ficoll al 40 % y se analizaron las muestras en un contador gamma.

35

Tabla 4 (asociada con la Figura 6). La identificación comprehensiva de anticuerpos específicos para receptores superficiales expresados a niveles bajos e intermedios requiere la secuenciación profunda del combinado de anticuerpos seleccionado diferencialmente.

Secuenciación		Receptores expresados a nivel alto (Nivel de expresión)		Receptores expresados a nivel bajo (receptores de expresión expresados (Nivel de expresión)	
Tipo de secuenciación	n.º de clones secuenciados	CD54 (250.000)	HER2 (100.000)	CD24 (8.000)	CD130 (6.000)
Convencional (Sanger)	91	47	2	-	-
	255	ND		-	-
	813	ND	4	-	-
Profundidad (4-5-4)	~290 000 secuencias	ND	511	3	5

Método de selección por afinidad diferencial descrito anteriormente

Método de cribado invertido usual

40

La tabla muestra el número de clones de anticuerpos recuperados específicos de cada receptor superficial

expresado como una función del número de clones de anticuerpos secuenciados. Se determinaron las especificidades del receptor de clones de anticuerpos individuales como se describe en la Figura 6.

5 El cribado análogo de 96 clones del combinado de anticuerpos seleccionado diferencialmente identificó 47 secuencias específicas para el receptor ICAM-1 superficial expresado a nivel alto (Tabla 4).

10 Los inventores se preguntaron a continuación si los anticuerpos (secuencias) específicos de los receptores superficiales expresados a niveles alto, intermedio y bajo, respectivamente, se identificaron mediante secuenciación de 91, 255, u 813 clones de anticuerpos repicados aleatoriamente o tras la secuenciación profunda de ~290.000 clones de anticuerpos repicados aleatoriamente.

15 Se identificó CD54 como receptor superficial expresado a nivel alto con 250.000 copias/célula mediante los análisis scatchard (no se muestran los datos). El cribado de 96 clones del combinado de anticuerpos "DnonT" seleccionado diferencialmente identificó 47 clones específicos de CD54 (Tabla 4). HER2, con 100.000 copias/célula representa un receptor superficial muy expresado y CD24, con 8.000 y CD130 con 6.000 copias/célula representa receptores superficiales expresados a nivel bajo (Figura 4 y 5).

20 Los anticuerpos (secuencias) específicos del receptor ICAM-1 superficial expresado a nivel muy alto se identificaron mediante todas las estrategias de cribado (Tabla 4 y no se muestran los datos). Por el contrario, no se identificaron anticuerpos específicos para los receptores superficiales expresados a nivel bajo mediante el cribado convencional de hasta 813 clones repicados aleatoriamente (Tabla 4). Sorprendentemente, y en marcado contraste, se identificaron anticuerpos específicos para los receptores superficiales CD24 y CD130 expresados a niveles bajos mediante secuenciación profunda.

25 Se examinó el efecto de aumentar la profundidad de la secuencia sobre los anticuerpos recuperados para los receptores superficiales expresados diferencialmente que se expresan a niveles altos, intermedios y bajos de la siguiente forma:

30 Se determinaron las secuencias de clones de anticuerpos tres combinados de aglutinantes de tamaño creciente seleccionados aleatoriamente (91 clones, 255 clones, y 813 clones, respectivamente). Posteriormente, se analizaron los clones que se encontraron en los tres combinados ("clones abundantes"), se analizaron los clones que se encontraban solo en los dos combinados más grandes ("clones menos frecuentes"), o solo en el combinado más grande ("clones raros") para la unión de células DU145 mediante FACS.

35 Los niveles promedio de expresión diana de los receptores dirigidos por clones abundantes, menos frecuentes, y raros disminuyeron con la disminución de la prevalencia en el combinado de anticuerpos seleccionado diferencialmente (Figura 7), demostrando que el aumento de la profundidad de la secuencia da como resultado la identificación de anticuerpos específicos para los receptores superficiales expresados diferencialmente a niveles *decrecientes* (inferiores) sobre las células diana (frente a las no diana).

40 **Ejemplo 3 - Derivación de las ecuaciones de selección por afinidad diferencial**

Aplicando la Ley universal de acción de masas (LMA), se puede calcular el número de ligandos necesario para aislar antiligandos de ligandos de expresión a nivel bajo y/o ligandos expresados diferencialmente a partir de bibliotecas de expresión de alta diversidad.

45 La LMA indica que la unión no covalente (enlace de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de Van der Waals o hidrófobas), entre un antiligando A y su ligando T diana, y su complejo AT se proporciona mediante la interacción del equilibrio $A + T \rightleftharpoons AT$ con la constante de disociación del equilibrio o de afinidad $K_d = [A][T] / [AT]$.

50 La interacción del equilibrio entre antiligandos con especificidad idéntica (A) para un ligando diana (T) puede describirse como

A de unión (bA) \rightleftharpoons A libre (fA) + T libre (fT) con

$$Kd = [fA]x \frac{[fT]}{[bA]} \tag{I}$$

55

Se sabe que la A o la T total es la suma de A o T libre y unido es decir, [A] (Total A) = [fA] + [bA], y [T] (Total T) = [fT] + [bA]

60 Por tanto, en (I) la sustitución de [fA] por [A]-[bA], y [fT] por [T]-[bA]

$$K_d = ([A] - [bA])x \frac{[T] - [bA]}{[bA]} \quad (II)$$

Que se redispone para formar

$$(K_d x [bA]) = ([A][T] - [A][bA]) - ([T][bA] - [bA]^2)$$

$$0 = [bA]^2 - ([A] + [T] + K_d)[bA] + [A][T]$$

Esta ecuación simultánea tiene la solución

$$[bA] = \frac{([A] + [T] + K_d)}{2} \pm \sqrt{\frac{([A] + [T] + K_d)^2}{4} - [A][T]}$$

donde la raíz negativa es una relevante:

$$[bA] = \frac{([A] + [T] + K_d)}{2} - \sqrt{\frac{([A] + [T] + K_d)^2}{4} - [A][T]}$$

15 Sustituyendo concentraciones por números de partículas / el número de partículas por mol (C) / unidad de volumen (V) da como resultado

$$\frac{bA}{(CxV)} = \frac{\left(\frac{A}{(CxV)} + \frac{T}{(CxV)} + K_d\right)}{2} - \sqrt{\frac{\left(\frac{A}{(CxV)} + \frac{T}{(CxV)} + K_d\right)^2}{4} - \frac{AT}{(CxV)^2}}$$

20 y se simplifica a

$$bA = \frac{(A + T + (K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxV))^2}{4} - AT} \quad (III)$$

donde A = número total de antiligandos A

T = número total de ligandos T

V = el volumen de reacción (litros)

C = constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ partículas/mol)

30 Dado que la LMA se aplica a cada reacción entre antiligandos diferentes con una afinidad y especificidad dadas para sus ligandos diana respectivos, puede calcularse el número de antiligandos unidos a ligandos tras un proceso de selección aplicando la LMA y la ecuación (III).

Además, no existe diferencia cualitativa entre los antiligandos asociados con las poblaciones de ligandos sustractores o diana, es decir, no existen cambios en las propiedades fisicoquímicas del ligando durante el método, entonces, el número de antiligandos que se han unido a ligandos diana en equilibrio será igual al número total de antiligandos unidos multiplicado por la relación de ligandos diana en las construcciones de ligandos diana al los ligandos totales (ligandos sustractores y diana):

Introduciendo

C_p = El número de construcciones de ligandos diana

C_s = El número de construcciones de ligandos sustractores

T_p = El número de ligandos T en C_p

T_s = El número de ligandos T en C_s

Si se mezcla las construcciones diana y del sustractor, entonces, el número total de ligandos será:

$$T_{Tot} = (T_p \times C_p + T_s \times C_s)$$

5 Y el número de antiligandos (A) unidos a las construcciones positivas en equilibrio (bAp) se proporciona por:

$$bA_p = bAx \frac{(T_p \times C_p)}{T_{Tot}} \quad (IV)$$

Además, la combinación de las ecuaciones (III) y (IV) da como resultado

10

$$bA_p = \left\{ \frac{(A + T + (K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxV))^2}{4} - AxT} \right\} x \left\{ \frac{(T_p \times C_p)}{(T_p \times C_p) + (T_s \times C_s)} \right\} \quad (V)$$

Ejemplo 4 - Optimización de las concentraciones de ligandos

15 Las ecuaciones ilustradas en el ejemplo 1 muestran que la utilización de altas concentraciones del primer ligando sustractor y el segundo ligando diana es instrumental en la recuperación eficaz de antiligandos con especificidad para la expresión a nivel bajo y los ligandos expresados diferencialmente, así como para la reducción de antiligandos con especificidad por los ligandos comúnmente expresados.

20 La concentración de ligando puede aumentarse por diversos medios. En todos los casos la concentración del ligando aumenta por el movimiento de dos acoplamiento bidimensionales de ligandos (acoplamiento a una fase sólida bidimensional) para usar el ligando libre en suspensión o solución (tridimensional).

25 En los casos donde la unión es dependiente del ligando que se está usando en su configuración nativa, tal como para los ligandos superficiales celulares, entonces la concentración del ligando se maximiza aumentando la relación del área superficial de la construcción del ligando al volumen de la construcción del ligando.

30 Por ejemplo, se pueden usar los antígenos superficiales celulares en la forma de vesículas de membranas plasmáticas pequeñas libres en suspensión, al contrario que utilizando células completas fijas a una superficie bidimensional. Esto tiene la ventaja adicional de aumentar la estabilidad del ligando en suspensión o solución, promoviendo por tanto la interacción del equilibrio ligando-antiligando.

35 Si la fuente del ligando tiene una forma esférica (o sustancialmente esférica), esto se describe matemáticamente mediante la siguiente ecuación:

$$A_p/V_p = (4\pi r^2) / (4\pi r^3/3) = \pi/3r$$

donde A_p = área de la esfera
 V_p = volumen de la esfera

40 es decir, cuánto más pequeño es el radio de la esfera, mayor es la relación ligandos/volumen y más particulado es el ligando (de tipo suspensión).

Ejemplo 5 - Opción preferida

45 Preferentemente, el método divulgado en el presente documento se usa para aislar antiligandos con especificidad por antígenos superficiales celulares en su configuración nativa e independientemente de su naturaleza (proteínas, hidratos de carbono, lípidos, complejo). Adicionalmente, los antígenos que están unidos a aquellos regulados por exceso o expresados de forma única en un tipo de célula en comparación con otra (por ejemplo, célula cancerosa transformada, célula vírica/microbiana/parasítica/fúngica infectada u otro agonista estimulado o células activadas por infección frente a células del control).

50 Cuando se utilizan para la selección de antiligandos derivados de anticuerpos (por ejemplo, antiligandos que codifican scFv, Fab, o Fv), el método, de forma simultánea con el proceso de cribado, genera candidatos de anticuerpos terapéuticos que reaccionan con el antígeno diana en su configuración nativa en la membrana celular.

55 Debido a que son necesarias dichas grandes concentraciones de antígeno, el antígeno se usa en una forma que no mejora la reacción en equilibrio. Por lo tanto, se usa antígeno en formas que ocupan el mínimo espacio e imponen poco aumento en la viscosidad y las fuerzas de cizalladura.

60

5 Por ejemplo, cuando se buscan antiligandos para antígenos superficiales celulares, se puede usar un proceso de selección por afinidad competitivo usando células diana completa y un exceso de membranas celulares sustractoras mezcladas con elementos de una biblioteca de antiligandos de elevada diversificación molecular, seguido por separación de densidad sobre un gradiente de albúmina de suero bovino en Ficoll o Percoll y aislamiento selectivo de células diana y antiligandos específicos de antígenos sobrerregulados y en exceso de células diana.

10 En esta metodología, la población del ligando diana (antígeno) está en la forma de células completas (elevada densidad) y el ligando sustractor (antígeno) está en la forma de vesículas de la membrana plasmática o células enucleadas (baja densidad).

15 Las poblaciones de antígeno diana y sustractor se mezclan con miembros de una biblioteca de elevada diversidad molecular de una forma controlada según las ecuaciones descritas en el presente documento.

20 Por ejemplo, 5×10^7 células diana completas se mezclan con vesículas de la membrana celular de 1×10^{10} células sustractoras y se mezclan con miembros de una biblioteca de elevada diversidad molecular con un número de copias de antiligando específico de 200 (de forma típica, produciendo antiligandos de $K_d = 10^{-8} M$ cuando se seleccionan sobre antígeno puro), se puede esperar aislar antiligandos específicos para antígenos regulados en exceso 10 veces o más, incluidos los expresados a densidades tan bajas como 10.000 por célula diana.

25 La reacción se incuba para alcanzar el equilibrio. Tras la selección por afinidad competitiva, los elementos de la biblioteca unidos a la población diana se separan de los antiligandos no unidos y aquellos antiligandos unidos al antígeno sustractor de control mediante separación por centrifugación con densidad, dando como resultado un enriquecimiento en fagos específicos de los antígenos fuertemente expresados presentes entre la población estudiada.

30 Cuando la expresión del antígeno diana deseado es mayor en la población sustractora, el proceso se invierte, de forma que la población de ligando sustractor se convierte en la población ligando y viceversa.

Además de generar antiligandos con especificidad por ligandos expresados de forma diferencial y únicos, el uso de diferentes medios de separación por densidad en un gradiente de densidad, ofrece varias ventajas que incluyen:

- Separación física y espacial de los antiligandos complejados a ligandos positivos de los antiligandos no unidos y de los antiligandos con una especificidad de unión que aparece en la población del control.
- 35 • El lavado con Ficoll aumenta la fuerza de cizalla. De este modo, dicho lavado es más eficaz y se necesitan menos repeticiones de lavado (rondas de purificación por adsorción); y por tanto hay una disociación mínima de los antiligandos de interés específicamente unidos (mayor afinidad).
- 40 • No se requiere el etiquetado ni la modificación química de las células (en comparación con la selección por afinidad competitiva FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) o MACS (clasificación celular activada magnéticamente) que podría alterar la configuración/conformación del ligando en la superficie celular, y/o su composición.

45 ***Ejemplo 6 - Todas las vesículas de membrana como medio de separación***

Las células completas se pueden sustituir por vesículas de membrana producidas en medios de alta densidad, permitiendo utilizar concentraciones de ligando incluso más altas sin afectar negativamente la reacción en equilibrio.

50 ***Ejemplo 7 - Analizar los efectos de los estímulos sobre la sobrerregulación/infrarregulación del ligando.***

En una opción adicional, el método divulgado en el presente documento se puede utilizar para aislar antiligandos con especificidad por ligandos celulares que se expresan a densidades muy bajas solamente en un pequeño número de células entre la población de células en estudio.

55 Por ejemplo, se puede sospechar que cierto estímulo desencadena la sobrerregulación o infrarregulación de un antígeno de la superficie celular presente en una subpoblación celular desconocida presente en la sangre.

60 Células derivadas de sangre completa expuestas a este estímulo se pueden mezclar con membranas plasmáticas derivadas de sangre completa antes de su exposición al estímulo, y realizar una reacción de selección por afinidad competitiva análoga a la anteriormente descrita.

Ejemplo - 8 - Uso diagnóstico del método de cribado

65 Un ejemplo adicional de la divulgación, permite que los antiligandos contra ligandos presentes con una abundancia diferente en muestras biológicas (por ejemplo, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo) se aislen de bibliotecas con elevada diversidad molecular. Dichos antiligandos se pueden utilizar posteriormente para, por ejemplo, análisis de

expresión de proteínas e identificación de biomarcadores potenciales.

Si se utilizan concentraciones suficientemente altas de ligandos, el método divulgado en el presente documento permite el aislamiento selectivo de antiligandos contra ligandos sobrerregulados o únicos cuando se compara la composición de proteínas de dos muestras diferentes. Esto permite finalmente el aislamiento de antiligandos específicos de ligandos que son más abundantes en una población, comparada con otra población, de una forma que es independiente de las concentraciones de ligando relativas dentro de la población positiva para el ligando.

Debido a las concentraciones extremas de ligando necesarias para llevar a cabo esto último, el ligando debería usarse preferentemente en suspensión o solución. Por ejemplo, el ligando de la población diana se puede dividir y marcar en varias posiciones diferentes para minimizar la destrucción y la erradicación de ligandos relevantes, mientras que los ligandos de la población sustractora se pueden usar sin marcar o tratarse de forma simulada. El marcado de la población positiva para ligandos proporciona un medio para la recuperación posterior de los ligandos de la población positiva y los aglutinantes unidos a los ligandos de la población positiva solo mediante el uso de un ligando marcado complejoado con, por ejemplo, perlas magnéticas etiquetadas contadas.

Una aplicación de este método sería combinar muestras de plasma de una población de pacientes con una determinada enfermedad y comprarlas con muestras de plasma de una población de control. En este caso, las muestras de plasma del paciente se dividirían y marcarían, y la población de control quedaría sin marcar.

REFERENCIAS

- Barbas CF, Kang As, Lerner RA y Benkovic SJ, (1991), Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7978-7982;
- Beck et al. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 10, 345-352
- Beers et al. (2008). Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood* 112, 4170-4177.
- Bentley DR, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008; 456: 53-59.
- Carlsson, R. et al. (1988) Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *J Immunol* 140, 2484.
- Chiswell DJ y McCafferty J, (1992), Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.* 10, 80-84
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD y Winter G, (1991), Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628
- Cragg, M. S., y Glennie, M. J. (2004). Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103, 2738-2743
- Dower, W.J., CWIRLA, S.E. y N.V., AT. (1991) Recombinant Library Screening Methods. In: *World Intellectual Property Organization*. SMITH, W.M., United States.
- Drmanac R, et al. Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-assembling DNA Nanoarrays. *Science* 2010; 327: 78-81
- Felici F, Luzzago A, Manaci P, Nicosia A, Sollazzo M y Traboni C, (1995), Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage. *Biotechnol. Annual Rev.* 1, 149-183
- Francisco, J.A., Stathopoulos, C., Warren, R.A., Kilburn, D.G. y Georgiou, G. (1993) Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Biotechnology (N Y)* 11, 491.
- Fransson, J., Tornberg, U. C., Borrebaeck, C. A., Carlsson, R., y Frendeus, B. (2006). Rapid induction of apoptosis in B-cell lymphoma by functionally isolated human antibodies. *Int J Cancer* 119, 349-358.
- Gao, C., Lin, C.H., Lo, C.H., Mao, S., Wirsching, P., Lerner, RA y Janda, K.D. (1997) Making chemistry selectable by linking it to infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 11777.
- Hanes, J. y Pluckthun, A. (1997) *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4937.

- Harris TD, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science* 2008; 320:106-109.
- 5 • He, M. y Taussig, M.J. (1997) Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res* 25, 5132.
- Hoogenboom HR y Winter G, (1992), By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 227, 381-388).
- 10 • Hoogenboom HR, deBruine AP, Hutton SE, Hoet RM, Arends JW y Rooves RC, (1998), Antibody phage display technology and its application. *Immunotechnology* 4(1), 1-20.
- Hoogenboom, H. R. (2002). Overview of antibody phage display technology and its applications. In *Methods in Molecular Biology* P.M. O'Brien, y R. Aitken, eds. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.), pp. 1-37.
- 15 • Jacobsson, K. y Frykberg, L. (1995) Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display. *Biotechniques* 18, 878.
- Katz BA, (1997), Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by peptide display. *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 27-45
- 20 • Kay BK y Paul JI, (1996), High-throughput screening strategies to identify inhibitors of protein-protein interactions. *Mol. Divers.* 1, 139-140).
- Koide, A., Bailey, C.W., Huang, X. y Koide, S. (1998) The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 284, 1141.
- 25 • Liu et al. (2004). Mapping tumor epitope space by direct selection of single-chain Fv antibody libraries on prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 704-710.
- 30 • Lundquist PM, et al. Parallel confocal detection of single molecules in real time. *Optics Letters* 2008; 33: 1026-1028.
- Margulies M, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-380.
- 35 • Markland, W., Roberts, B.L., Saxena, M.J., Guterman, S.K. y Ladner, R.C. (1991) Design, construction and function of a multicopy display vector using fusions to the major coat protein of bacteriophage M13. *Gene* 109, 13.
- 40 • Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD y Winter G, (1991), By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581-597
- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. y Dower, W.J. (1994) An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9022.
- 45 • McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. y Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552.
- Mutuberria et al. (1999). Model systems to study the parameters determining the success of phage antibody selections on complex antigens. *J Immunol Methods* 231, 65-81.
- 50 • Osbourn et al. (1998). Pathfinder selection: in situ isolation of novel antibodies. *Immunotechnology* 3, 293-302.
- Shendure J, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 2005; 309: 1728-1732.
- 55 • Siegel et al. (1997). Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology. *J Immunol Methods* 206, 73-85
- 60 • Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315.
- Smith, G.P. y Scott, J.K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 217, 228.
- 65 • Stahl et al. (1989) A dual expression system for the generation, analysis and purification of antibodies to a repeated sequence of the Plasmodium falciparum antigen Pf155/RESA. *J Immunol Methods* 124, 43.

- Weng, S., Gu, K., Hammond, P.W., Lohse, P., Rise, C., Wagner, R.W., Wright, M.C. y Kuimelis, R.G. (2002) Generating addressable protein microarrays with PROfusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics* 2, 48.
- 5
- Williams, B.R. y Sharon, J. (2002) Polyclonal anti-colorectal cancer Fab phage display library selected in one round using density gradient centrifugation to separate antigen-bound and free phage. *Immunol Lett* 81, 141.
- 10
- Winter y McCafferty (1996) *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual* Ed Kay, Academic Press, Inc ISBN 0-12-402380-0
 - Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. y Hoogenboom, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433.

REIVINDICACIONES

1. Un método de aislar al menos un antiligando, en el que el antiligando es un polipéptido, frente a al menos un ligando diana expresado diferencialmente, en donde el ligando diana es un antígeno de la superficie celular, en donde el ligando diana expresado diferencialmente es un ligando de baja expresión, en donde el ligando de baja expresión se expresa a entre 5.000 y 20.000 copias por célula, en donde el método comprende las etapas de:

(a) llevar a cabo la selección por afinidad diferencial sobre una biblioteca de moléculas antiligandos con el fin de aislar al menos un antiligando, en donde la etapa de selección por afinidad diferencial comprende además las subetapas de:

- (i) proporcionar una biblioteca de antiligandos;
- (ii) proporcionar una primera población de ligandos que comprende un ligando fijo a o incorporado en una construcción de ligando sustractor;
- (iii) proporcionar una segunda población de ligandos que comprende el mismo ligando que en la etapa (ii), fijo a o incorporado en una construcción de ligando diana;
- (iv) determinar una cantidad de la construcción del ligando sustractor y la construcción del ligando diana en las poblaciones que utilizan una o más ecuaciones derivadas de la ley universal de acción de masas

$$\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} = K_{eq}$$

donde:

A, B, C y D = son los participantes en la reacción (reactivos y productos)
a, b, c, y d = los coeficientes necesarios para obtener una ecuación química equilibrada

con el fin de permitir el aislamiento de una molécula dirigida contra ligando para un ligando diana expresado diferencialmente, en donde la ecuación es cualquiera de:

$$bA = \frac{(A + T + (K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxV))^2}{4} - AxT}$$

donde

bA = Antiligando unido
A = Número total de antiligandos
T = Número total de ligandos
C = Constante de Avogrado ($6,022 \times 10^{23}$ partículas/moles)
V = Volumen de reacción (litros)
K_d = Constante de disociación en equilibrio

o

$$bA = \left\{ \frac{(A + T + (K_d)x(CxV))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxV))^2}{4} - AxT} \right\} x \left\{ \frac{(T_p x C_p)}{((T_p x C_p) + (T_s x C_s))} \right\}$$

donde

bA_p = Antiligando unido
T_p = El número de ligandos en C_p
T_s = El número de ligandos en C_s
C_p = El número de construcciones de ligandos diana
C_s = El número de construcciones de ligandos sustractores
A = Número total de antiligandos
T = Número total de ligandos
C = Constante de Avogrado ($6,022 \times 10^{23}$ partículas/moles)
V = Volumen de reacción (litros)
K_d = Constante de disociación en el equilibrio;

- (v) proporcionar la cantidad de construcción de ligando sustractor como se determina en la etapa (iv);
- (vi) proporcionar la cantidad de construcción de ligando diana como se determina en la etapa (iv);
- (vii) proporcionar medios de separación para aislar el antiligando unido a la construcción del ligando diana a

- partir de un antiligando unido a una construcción de ligando sustractor;
 (viii) exponer la biblioteca de (i) a las construcciones de ligandos proporcionadas por (v) y (vi) para permitir la unión de antiligandos a ligandos; y
 (ix) utilizar los medios de separación para aislar el antiligando unido al ligando fijo a o incorporado en la construcción del ligando diana;
- 5
- (b) a continuación llevar a cabo la secuenciación de alto rendimiento sobre los antiligandos aislados durante la etapa (a); y,
 (c) a continuación llevar a cabo el cribado confirmatorio de la unión específica del antiligando para el ligando expresado diferencialmente.
- 10
2. El método de la reivindicación 1 en el que el antígeno de la superficie celular está en su forma nativa, opcionalmente en el que el antígeno de la superficie celular está en un receptor superficial celular.
- 15
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2 en la que la etapa de secuenciación de alto rendimiento se realiza mediante secuenciación 454, métodos Illumina, SOLiD o el sistema Helicos, y/o; en el que la etapa de cribado confirmatorio se lleva a cabo mediante citometría de flujo, FMAT, ELISA, MSD o CBA.
- 20
4. El método de reivindicación 1 en el que el ligando no se expresa en uno de cualquiera de la construcción diana o la construcción sustractora, y/o; que comprende además una etapa de liberar el antiligando del ligando.
- 25
5. El método de las reivindicaciones 1 o 4 en el que las etapas de (ii) a (ix) se realizan en paralelo para aislar una pluralidad de antiligandos contra una pluralidad de diferentes ligandos, y/o; por lo cual las etapas (ii) a (ix) se repiten una o más veces.
- 30
6. El método de las reivindicaciones 1, 4 o 5 en el que la cantidad de uno de la construcción sustractora o la construcción diana se proporciona en exceso respecto a la cantidad del otro de la construcción sustractora o la construcción diana, en donde el exceso de ligando está entre 10 y 1000 veces, o 2 y 10 veces, o 1000 y 1.000.000 veces.
- 35
7. El método de las reivindicaciones 1 o 4 a 6 en el que el medio de separación se selecciona entre al menos uno de un soporte sólido, una membrana celular y/o partes de la misma, una membrana sintética, perlas, etiquetas químicas y ligandos libres.
- 40
8. El método de las reivindicaciones 1 o 4 a 7 en el que el medio de separación de las construcciones sustractora y diana tienen una densidad diferente.
- 45
9. El método de las reivindicaciones 1 o 4 a 8 en el que el medio de separación de la construcción sustractora es una vesícula de membrana o una membrana de célula completa.
- 50
10. El método de las reivindicaciones 1 o 4 a 9 en el que la etapa (ix) se lleva a cabo mediante al menos uno de centrifugación con densidad, secuestro en soporte sólido, secuestro de perlas magnéticas, unión a una etiqueta química y reparto en fase acuosa.
- 55
11. El método de cualquier reivindicación anterior en el que la biblioteca de la etapa (a) es una biblioteca de expresión que comprende una pluralidad de miembros que expresan antiligandos, en el que opcionalmente, la biblioteca de expresión es una biblioteca de expresión en fagos.
- 60
12. El método de cualquier reivindicación anterior en el que el ligando es al menos uno seleccionado entre antígenos; ligandos de receptores; y dianas enzimáticas que comprenden al menos uno de entre hidratos de carbono; proteínas; péptidos; lípidos; polinucleótidos; moléculas inorgánicas y moléculas conjugadas.
13. El método de cualquier reivindicación anterior en el que la biblioteca de antiligandos se construye a partir de al menos uno de anticuerpos y variantes de unión con el antígeno, derivados o fragmentos de los mismos; moléculas que forman parte de estructuras principales con superficies variables diseñadas mediante ingeniería genética; receptores; y enzimas.
14. El método de las reivindicaciones 1 o 4 a 13 que comprende una etapa adicional de exponer el ligando y su medio de separación a un estímulo que altera la expresión de los ligandos diana en dichas construcciones de ligando.

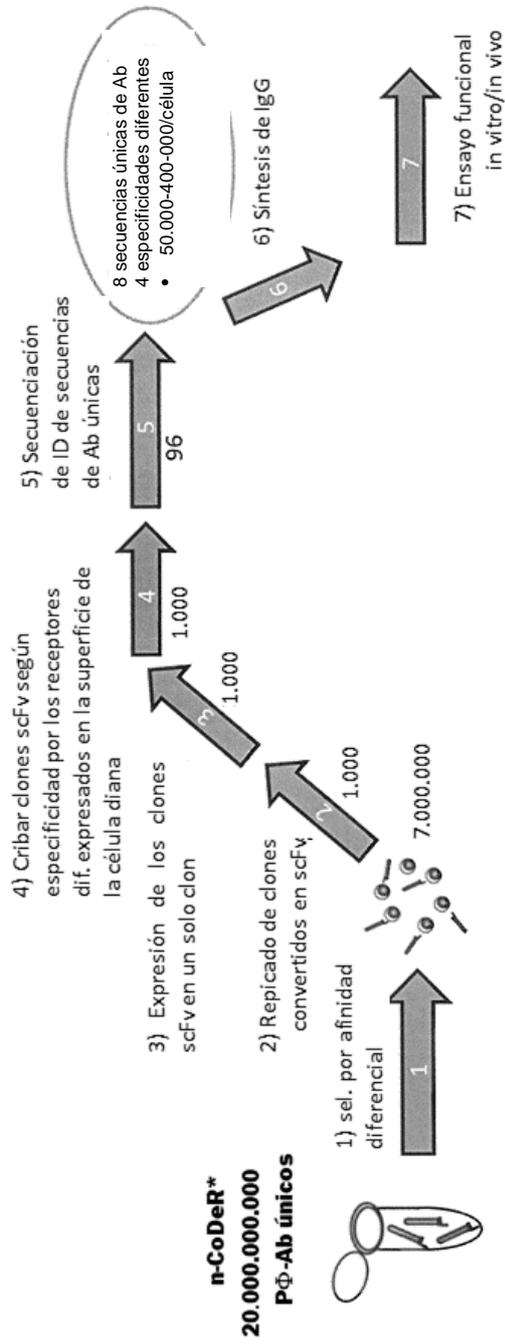


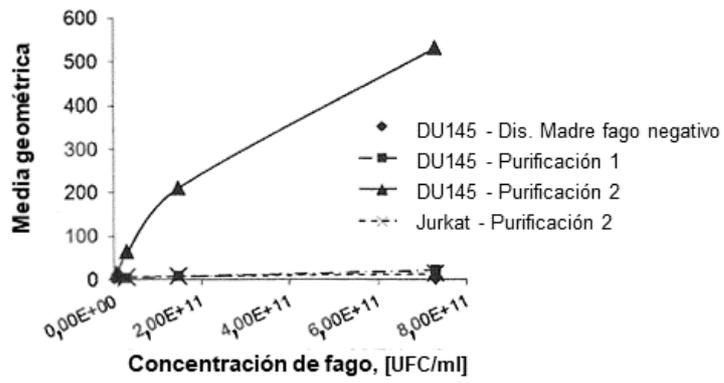
Figura 1

Expresión de antígenos en células TARINOT			Ronda de purificación por adsorción					
Tipo de antígeno	Especificidad del fagémido	Antígenos/ célula TAR (tmp)	Antígenos/ célula NOT (tmp)	Frecuencia relativa	R1 Tipo	Entrada de fago (p)	Recuperado (bp+)	Frecuencia relativa
1	+ Célula restringida por antígeno	200.000	0	1	1	6,00E+02	413	0,2650
2	+ Célula restringida por antígeno	60.000	0	1	2	6,00E+02	214	0,1371
3	+ Célula restringida por antígeno	25.000	0	1	3	6,00E+02	130	0,0834
4	+ Célula restringida por antígeno	5.000	0	1	4	6,00E+02	31	0,0202
5	+ Célula enriquecida en antígeno	150.000	10.000	1	5	6,00E+02	141	0,0901
6	+ Célula enriquecida en antígeno	50.000	10.000	1	6	6,00E+02	56	0,0356
7	+ Cél. - Cél Antígeno expresado común	1.000.000	1.000.000	10	7	6,00E+02	146	0,0936
8	+ Cél. - Cél Antígeno expresado común	500.000	500.000	10	8	6,00E+02	146	0,0934
9	+ Cél. - Cél Antígeno expresado común	100.000	100.000	10	9	6,00E+02	143	0,0918
10	+ Cél. - Cél Antígeno expresado común	50.000	50.000	10	10	6,00E+02	140	0,0899
Ecuación (VI) ¹⁾								
$bp+ = p(A^V)^Kd + (tmp^Cp + tmp^Cn) / (tmp^Cp)$								
Parámetros de selección								
Kd afinidad		3,00 E-09						
frec. exp. scFv/fago		3,00 E-01						
entrada de fago R1 específica de genotipo/fenotipo		2,00E+03						
volumen de reacción V (l)								
N.º de células usadas en las rondas de selección								
Ronda de selección								
R1	Células TAR (Cp)	5,00E+07	Células NOT (Cn)					
R2		5,00E+06						
R3		5,00E+06						
Factor de amplificación								
(AF) R1-R2		1,50E+03						
(AF) R2-R3		6,00E+04						
Constante de Avogadro (A)								
		6,022E+23						

Figura 2



A



B

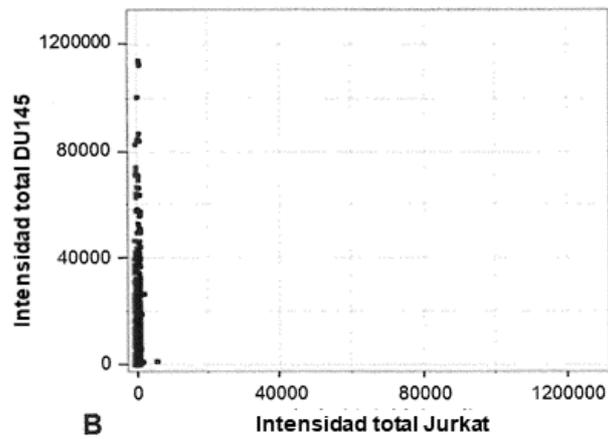
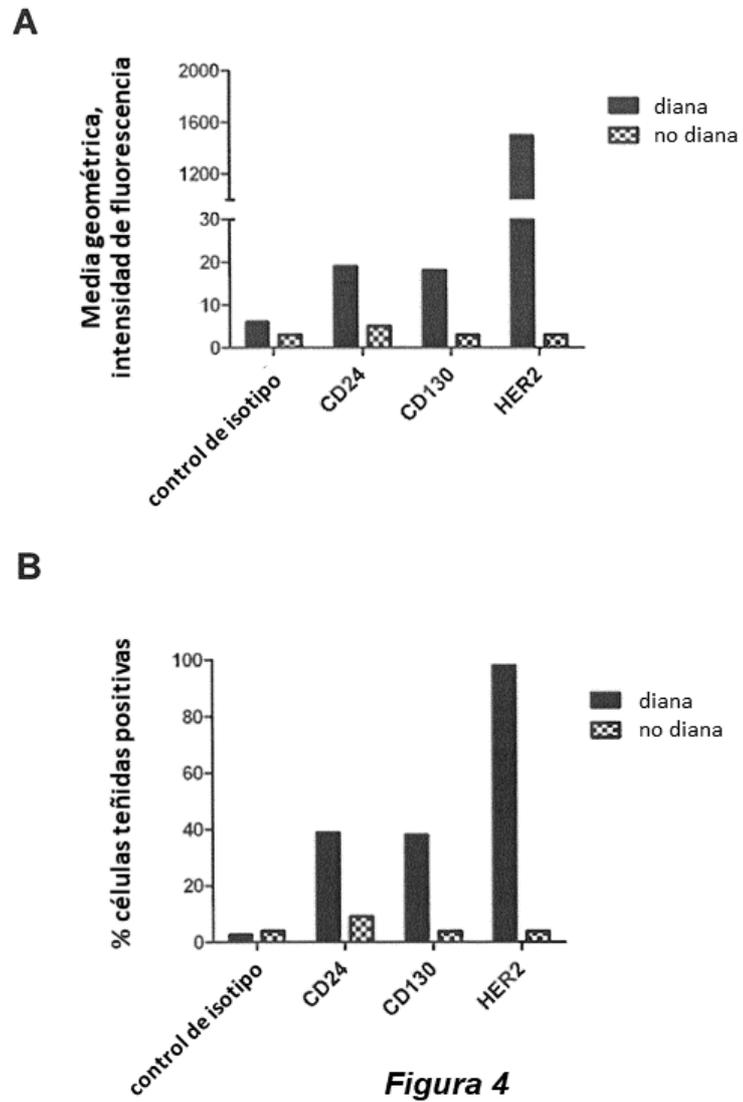


Figura 3



A

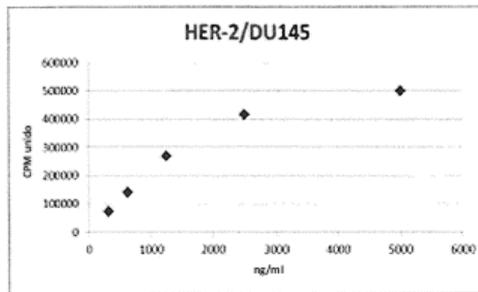
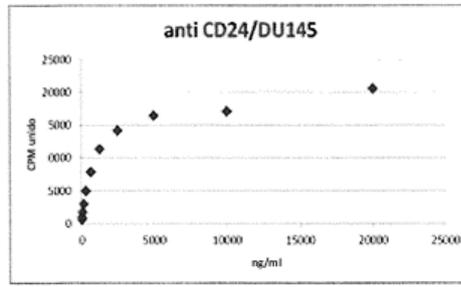
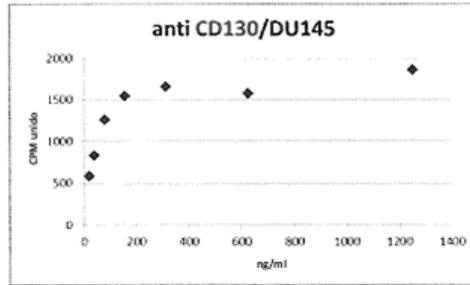


Figura 5

B

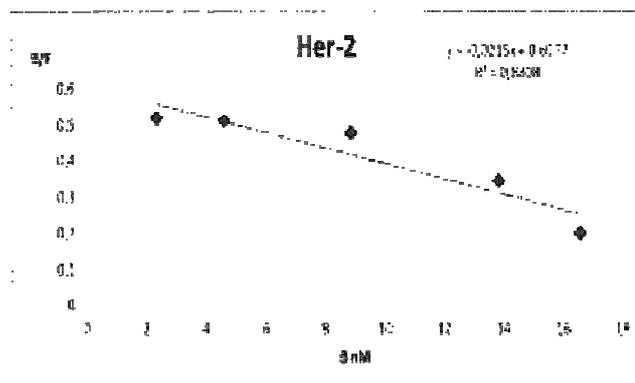
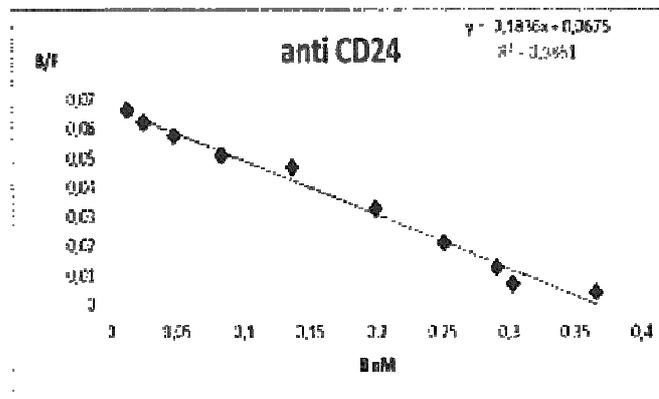
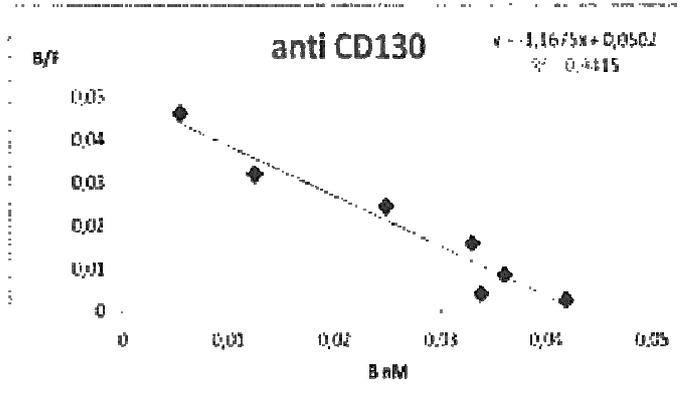


Figura 5 (cont.)

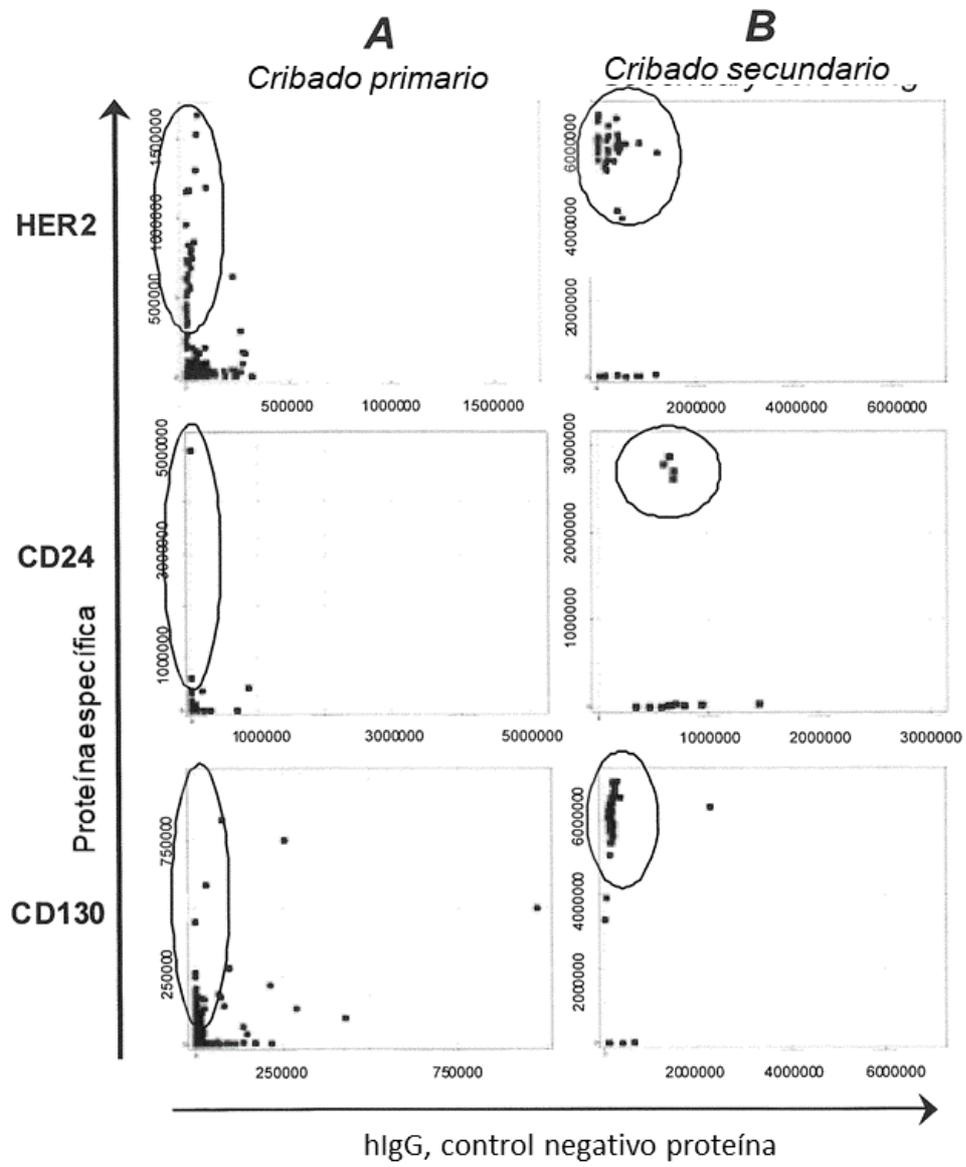


Figura 6

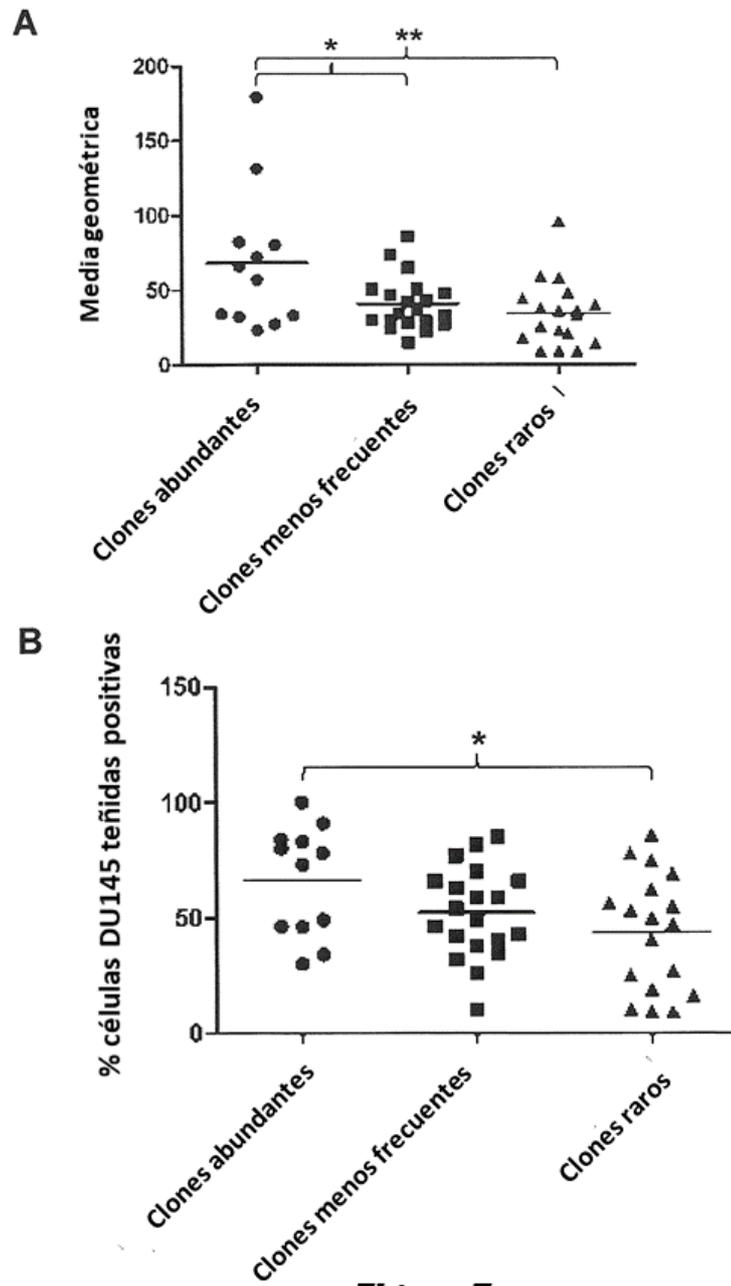


Figura 7

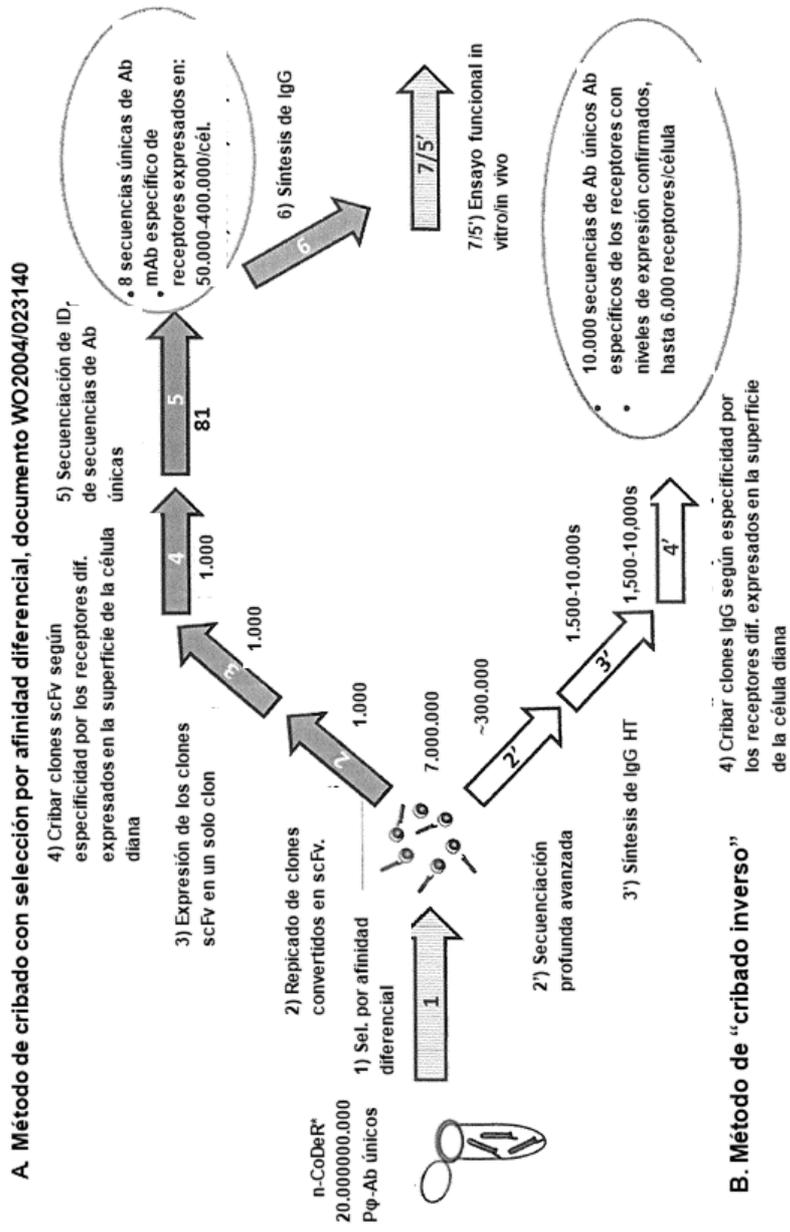


Figura 8

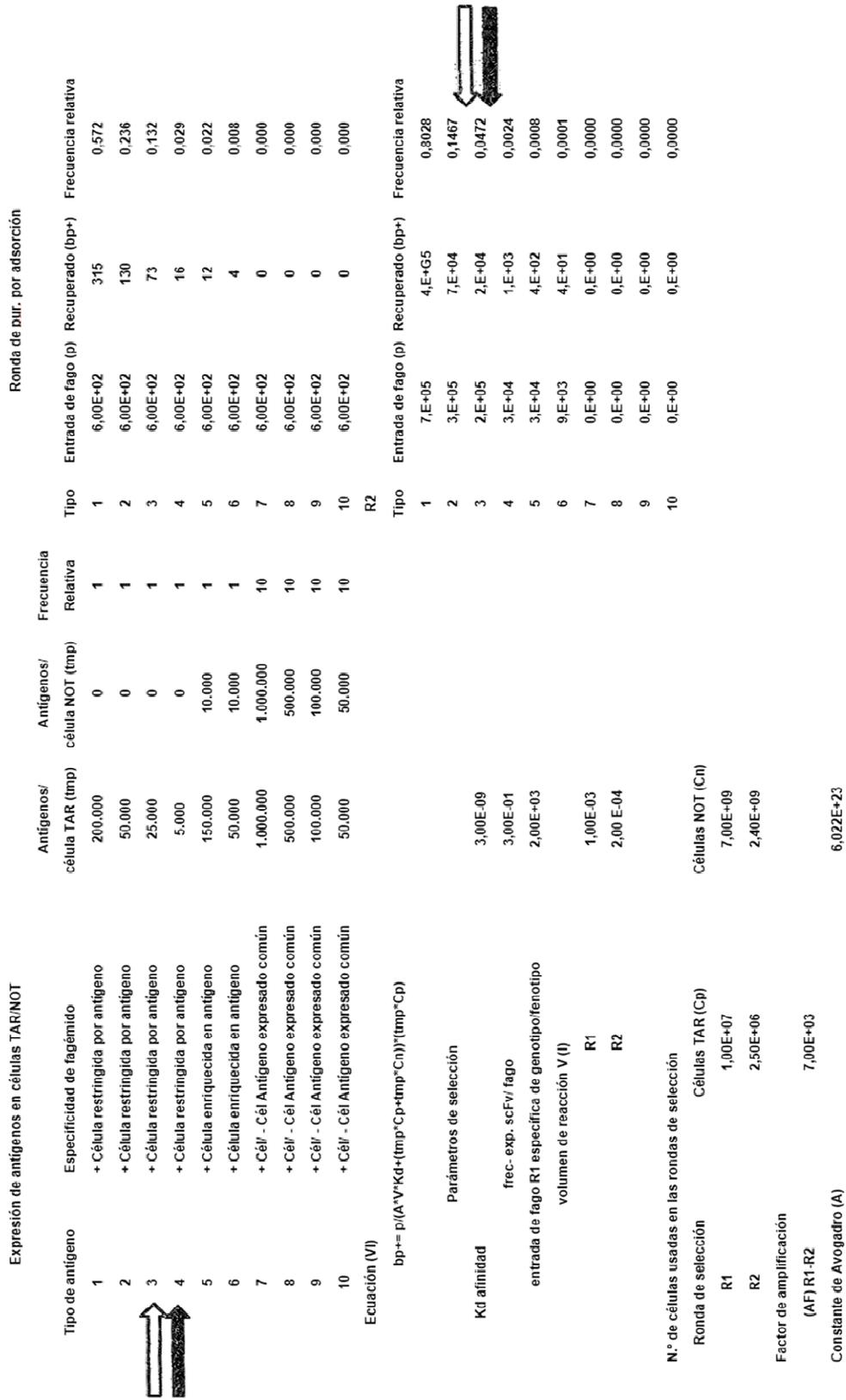


Figura 9