

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 303**

51 Int. Cl.:

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/EP2012/005162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13087215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12805590 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2791677**

54 Título: **Estrategia general para la selección de bibliotecas de anticuerpos**

30 Prioridad:

16.12.2011 EP 11009901

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**BECKER, STEFAN;
HEISELER, TIM;
MAASS, ALEXANDER y
KOLMAR, HARALD**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 742 303 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

Estrategia general para la selección de bibliotecas de anticuerpos

5 La tecnología de despliegue de fagos fue introducida originalmente por George Smith hace más de 25 años (Smith 1985) y se ha convertido en una herramienta indispensable en biotecnología molecular para identificar péptidos y, especialmente, moléculas de anticuerpo con características de unión predefinidas a partir de extensas bibliotecas. Desde entonces, se han publicados muchas mejoras y en la actualidad se dispone de conceptos de selección para
10 identificar moléculas de unión prácticamente frente a cualquier proteína diana (Bradbury y cols. 2011). Además, en los últimos años el despliegue en la superficie de bacterias y, especialmente, de levaduras se ha convertido en una alternativa cada vez más popular a las aplicaciones de selección de bibliotecas mediante despliegue de fagos (Pepper y cols., 2008, van Blois y cols. 2011).

15 En general, la selección de bibliotecas implica la exposición de una población de moléculas de unión sobre la superficie de una entidad de replicación y ponerlas en contacto con una pareja de interacción de interés, como es el caso de un anticuerpo que despliega una molécula de antígeno. La configuración experimental se diseña de manera que aquellas partículas de fago o células microbianas que despliegan un anticuerpo específico de diana puedan aislarse a partir de la población, por ejemplo, mediante ciclos de selección por afinidad (*biopanning*) o separación celular. Idealmente, sería necesaria una única ronda de selección para obtener las variantes de proteína deseadas. No obstante, el
20 enriquecimiento de ligantes específicos se ve limitado por la unión inespecífica que requiere rondas recurrentes de selección y amplificación para obtener los mejores ligantes de la biblioteca (Vodnik y cols. 2011). En particular, la primera ronda de selección es crítica, ya que cabe esperarse de bibliotecas extensas que los ligantes específicos constituyan solo una pequeña fracción de la población inicial ya que predominan en gran medida los ligantes inespecíficos sobre aquellos que interaccionan de manera específica. En consecuencia, deberán controlarse
25 adecuadamente y optimizarse las condiciones de cualquier experimento de selección individual de modo que sean suficientemente rigurosas como para eliminar los ligantes inespecíficos pero suficientemente suaves como para mantener intacta la unión a la diana de los miembros de la biblioteca que interaccionan específicamente (Liu y cols. 2009).

30 Puesto que la probabilidad de obtener ligantes de alta afinidad aumenta con el tamaño de la biblioteca (Steiner, Forrer 2008), se han establecidos bibliotecas cada vez más extensas que pueden exceder de 10^{10} variantes diferentes (Rother y cols. 2008, Brockmann y cols. 2011). No obstante, es sabido que la amplificación repetida de las bibliotecas, tal como se produce en cada ronda de selección, reduce la diversidad y limita el número de candidatos que pueden identificarse en un experimento de selección de bibliotecas (Derda y cols. 2011). En consecuencia, es altamente
35 deseable reducir el número de rondas de selección al mínimo, de manera óptima a una única ronda. Conceptualmente, esto puede conseguirse configurando un método en el que la interacción transitoria y relativamente débil de la diana y el miembro de la biblioteca se traduzca en una unión covalente de una molécula de marcaje que pueda usarse como asa de purificación y permita la aplicación de condiciones bastante rigurosas para eliminar a los miembros de la biblioteca que se unen de manera inespecífica.

40 La deposición catalizada por marcador (*catalysed reporter deposition, CARD*) se ha utilizado ampliamente en inmunohistoquímica para la biotinylation de proteínas (Bobrow y cols., 1989, 1991, 1992). Esta técnica se basa en la formación mediada por peroxidasa de rábano picante (HRP) de un radical biotina-tiramida que reacciona con facilidad con las proteínas que están en su proximidad dando lugar a la formación de un enlace covalente entre los restos de
45 biotina y tirosina de las proteínas (**figura 1**). Para establecer una biotinylation selectiva de los miembros de la biblioteca de despliegue de fagos o de la superficie celular a los que se une una molécula diana, hemos utilizado el hecho de que la biotinylation mediada por HRP requiere la presencia de peróxido de hidrógeno. El sistema ³CARD descrito en este documento combina la actividad de tres enzimas diferentes, en concreto una peroxidasa, una oxidasa y una catalasa. En primer lugar, la HRP se acopla con todos los miembros de una población inicial, que se utiliza como
50 ejemplo para su uso en la configuración experimental de una biblioteca de despliegue de fagos (**figura 1a**). La biotinylation de fagos mediante HRP requiere la presencia de biotina-tiramida (**figura 5**) y de peróxido de hidrógeno. En la configuración ³CARD se genera H₂O₂ mediante una segunda enzima que se conjuga al antígeno de interés (**figura 1b, c**). Las oxidasas de azúcares como la galactosa o la glucosa oxidasa catalizan la oxidación de los azúcares a través de la transferencia de electrones al oxígeno, lo que da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno. El
55 peróxido de hidrógeno solo se genera a concentraciones más altas sobre aquellas partículas de fago a las que se ha unido el complejo antígeno-oxidasa ya que la mezcla de reacción contiene una tercera enzima catalasa que degrada de manera muy eficaz el peróxido de hidrógeno. En consecuencia, la transferencia del H₂O₂ a la HRP y la posterior biotinylation del fago solo deberían tener lugar en los fagos que se unen al antígeno que tienen la oxidasa muy próxima a la HRP. A continuación, los fagos marcados específicamente pueden recuperarse mediante ciclos de selección por
60 afinidad a estreptavidina inmovilizada y someterse a condiciones de lavado muy rigurosas antes de la infección con fagos de las bacterias.

En el documento US 2002/004215 se describe un método de selección de moléculas que comprende: (a) poner en contacto una molécula marcada (como biotina-tiramina), un primer ligando marcador capaz de unirse a un segundo
65 miembro de un par de unión específico, un segundo miembro del par de unión específico y una enzima asociada con

el primer ligando marcador que es capaz de catalizar la unión del marcador a otras moléculas; (b) permitir la unión del primer ligando marcador al segundo miembro del par de unión específico; y (c) unir el marcador a otras moléculas en la proximidad del primer ligando marcador unido. El método se utiliza para el marcaje y la selección de moléculas sobre las superficies celulares y sobre la superficie de partículas víricas. Los sistemas de clonación y expresión de moléculas pueden llevarse a cabo en diversas células huésped como levaduras y vectores adecuados como plásmidos, fagos y fagémidos. Esta deposición catalizada por marcador (CARD) se explica mediante ejemplos con el uso de la peroxidasa de rábano picante (HRP) para catalizar la deposición de tiramina biotinilada. Esta reacción está catalizada por radicales libres de oxígeno generados por la HRP en presencia de H₂O₂.

5
10 No obstante, en la técnica no se menciona la CARD para potenciar la eficacia de los sistemas de despliegue de fagos, bacterias o levaduras.

15 Existe en la técnica una gran necesidad de potenciar esta eficacia. Como se explicó anteriormente, el aislamiento de ligantes específicos sigue siendo altamente empírico y requiere de la adaptación de la configuración experimental básicamente para cada configuración específica que comprende un determinado sistema de despliegue y un ligando específico.

20 Por tanto, el objeto de la presente invención ha sido proporcionar un sistema de despliegue eficaz que, entre otras cosas, permita la reducción de los pasos de selección/amplificación necesarios para aislar ligantes altamente específicos.

En la presente invención se describe una mejora sorprendentemente fácil de establecer y altamente eficaz de los sistemas de despliegue conocidos en la técnica.

25 En una primera realización, la presente invención se refiere a un nuevo método para el aislamiento de entidades de replicación marcadas específicamente, comprendiendo dicho método

- 30 a) proporcionar en una mezcla de reacción un conjunto de entidades de replicación que despliegan variantes de una molécula receptora sobre su superficie y que tienen una primera o segunda enzima unida a dicha superficie, comprendiendo la mezcla de reacción una tercera enzima capaz de descomponer el exceso de producto de dicha primera y/o segunda enzima, siendo la primera enzima una peroxidasa, siendo la segunda enzima una oxidasa y siendo la tercera enzima una catalasa,
- 35 b) añadir a la mezcla de la etapa a) moléculas de ligando que están unidas a dicha primera enzima si dichas entidades están unidas a dicha segunda enzima, o dichos ligandos están unidos a dicha segunda enzima si dichas entidades están unidas a dicha primera enzima,
- 40 c) añadir a la mezcla de reacción un sustrato para la segunda enzima, siendo utilizado el sustrato por dicha segunda enzima en una reacción enzimática para producir un producto que es utilizado por dicha primera enzima para convertir un cosustrato de dicha primera enzima en una molécula marcadora reactiva que se une físicamente a la correspondiente entidad de replicación, marcando específicamente de este modo la entidad de replicación, y
- 45 d) aislar las entidades de replicación marcadas específicamente,
- e) donde el cosustrato de dicha primera enzima es una tiramida conjugada a una molécula marcadora mediante un enlazador escindible, preferiblemente un puente disulfuro o una secuencia peptídica que puede ser escindida por una proteasa, preferiblemente una biotina-tiramida con un puente disulfuro escindible de la estructura proporcionada en la reivindicación 1.

En una realización preferida, la entidad de replicación se selecciona entre el grupo compuesto por un fago, un fagémido o una célula.

50 En una realización preferida adicional la entidad de replicación es una célula de levadura, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización preferida adicional el sustrato de la segunda enzima es glucosa y el producto es H₂O₂.

55 En una realización preferida adicional la molécula marcadora es biotina (2,4)-dinitrofenilo, fluoresceína o derivados de digoxigenina.

En una realización adicional preferida la molécula marcadora es biotina, y la etapa de aislamiento d) se lleva a cabo mediante cromatografía de afinidad sobre una matriz de avidina o estreptavidina.

60 En una realización adicional preferida la molécula marcadora es fluoresceína o una avidina o estreptavidina fluorescente unida a biotina y la etapa de aislamiento d) se lleva a cabo mediante separación de células activada por fluorescencia.

En una realización preferida adicional la molécula marcadora es biotina y el aislamiento comprende la separación magnética de células con la ayuda de partículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina o avidina unidas a la entidad marcada con biotina.

5 Una realización especialmente preferida de la presente invención es una entidad de replicación no natural que despliega diversas moléculas receptoras sobre su superficie y tiene una enzima acoplada a su superficie.

Una realización adicional especialmente preferida de la presente invención es una entidad de replicación no natural del párrafo anterior, seleccionándose la enzima entre el grupo compuesto por peroxidasa u oxidasa.

10 Una realización adicional especialmente preferida de la presente invención es la entidad de replicación no natural del párrafo anterior, donde la molécula receptora es un anticuerpo o un fragmento derivado de anticuerpo.

15 En la presente descripción se describe adicionalmente un kit de partes que comprende la entidad de replicación no natural de la invención, un sustrato y un cosustrato.

20 En la presente descripción se describe adicionalmente el kit del párrafo anterior, seleccionándose la entidad entre el grupo compuesto por un fago, un fagémido o una célula, siendo la célula preferiblemente una célula de levadura, más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la molécula receptora un anticuerpo, siendo la enzima unidad a la superficie de la entidad glucosa oxidasa o peroxidasa de rábano picante, siendo el sustrato glucosa y el cosustrato una tiramida acoplada a una molécula marcadora, preferiblemente biotina.

25 Por ejemplo, para establecer una biotinilación selectiva de los miembros de la biblioteca de despliegue de fagos o en la superficie celular a los que se une una molécula diana, la presente invención en una realización preferida utiliza el hecho de que la biotinilación mediada por peroxidasa de rábano picante (HRP, E.C.1.11.1.7) requiere la presencia de peróxido de hidrógeno. El sistema ³CARD descrito en este documento combina la actividad de tres enzimas diferentes, en concreto una peroxidasa, una oxidasa y una catalasa. En primer lugar, la HRP se acopla a todos los miembros de una población inicial, lo que está dentro de la configuración experimental de la biblioteca de despliegue de fagos para la selección de una población de partículas de fago (**figura 1a**). La biotinilación de fagos mediante HRP requiere la presencia de biotina-tiramida y de peróxido de hidrógeno. En la configuración ³CARD se genera H₂O₂ mediante una segunda enzima que se conjuga al antígeno de interés (**figura 1b, c**). Las oxidasas de azúcares como la galactosa o la glucosa oxidasa catalizan la oxidación de los azúcares a través de la transferencia de electrones al oxígeno, lo que da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno solo se genera a concentraciones más altas sobre aquellas partículas de fago a las que se ha unido el complejo antígeno-oxidasa ya que la mezcla de reacción contiene una tercera enzima catalasa que degrada de manera muy eficaz el peróxido de hidrógeno. Como consecuencia, la transferencia de H₂O₂ a la HRP y la posterior biotinilación del fago solo tienen lugar en los fagos que se unen al antígeno que tiene la oxidasa muy próxima a la HRP. A continuación, los fagos marcados específicamente pueden recuperarse mediante ciclos de selección por afinidad a estreptavidina inmovilizada y someterse a condiciones de lavado muy rigurosas antes de la infección con fagos de las bacterias.

40 En la parte de ejemplos de la presente patente los inventores describen la aplicación de ³CARD a la selección de bibliotecas de anticuerpos con un único dominio y presentan métodos sencillos para el acoplamiento de HRP a la superficie de los fagos y la conjugación de la oxidasa con la proteína diana, de modo que una reacción enzimática combinada sobre el fago da lugar a una biotinilación selectiva y a su aislamiento en una única ronda de selección.

45 Para que el procedimiento de selección del despliegue de fagos descrito en este documento sea funcional, los inventores han demostrado que puede llevarse a cabo una reacción de acoplamiento de una oxidasa y una peroxidasa sobre partículas de fago, donde el peróxido de hidrógeno generado por una oxidasa que está acoplada a la superficie del fago a través de la interacción antígeno/anticuerpo lleva finalmente al marcaje selectivo del fago unido y, por tanto, al acoplamiento entre genotipo y fenotipo. Además, tiene que establecerse un método sencillo para la conjugación de la proteína diana de interés a una oxidasa.

50 Para abordar estos puntos, se llevó a cabo un modelo experimental basado en el despliegue de fagos de un fragmento del anticuerpo de cadena sencilla VHH de camélido que se une selectivamente a la chaperona LipH de *Pseudomonas aeruginosa* (Wilhelm y cols. 2007). La presentación del dominio VHH anti-LipH sobre fagos se consiguió mediante fusión genética del fragmento VHH a pIII truncado usando el vector de despliegue de fagos pAK200 (Habicht y cols. 2007).

La invención se explica en parte en las figuras siguientes:

60 En la **figura 1** se muestra un esquema general del procedimiento de selección mediante despliegue de fagos ³CARD. **(a)** Deposición covalente de peroxidasa de rábano picante (HRP) en la superficie de las partículas de fago que despliegan una biblioteca de variantes de un anticuerpo (AC). **(b,c)** Generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por el conjugado antígeno-oxidasa (AgOx) y reacción acoplada con HRP que convierte la biotina-tiramida (BT) en un radical que queda capturado en la superficie del fago.

En la **figura 2** se muestra una reacción enzimática acoplada sobre el fago. **(a)** Acoplamiento de HRP a la superficie de las partículas de fago. La proteína LipH se acopló a los pocillos de una placa de microtitulación. Los fagos que despliegan un VHH anti-LipH (VHH α LipH) o proteína no relacionada que sirve como control se marcaron con HRP (+HRP) y se añadieron a los pocillos (barras gris oscuro). Los fagos VHH α LipH no conjugados sirvieron como control (barras gris claro). En los fagos VHH anti-LipH no marcados, la unión a la proteína diana del fago se verificó mediante la adición de un anticuerpo anti-pVIII conjugado con peroxidasa. La actividad HRP se detectó mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB) y la medición de la absorbancia a 450 nm. **(b)** Activación mediada por oxidasa de HRP sobre el fago. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubrieron con conjugado LipH-GOasa o, como control, con albúmina de suero bovino (BSA), respectivamente. Tras la adición de fagos VHH anti-LipH marcados con HRP (barras negras) o el fago control (barras blancas) y el lavado de las placas, se añadió galactosa y se midió la actividad de HRP tras la adición de TMB a 450 nm. Las barras de error representan la desviación estándar de las tres medidas.

En la **figura 3** se muestra el enriquecimiento de ligantes mediante la selección por 3 CARD. (a) ELISA de fagos para la unión a LipH de una mezcla 1:10 000 (blanco) y 1:100 000 (gris) del fago de unión a LipH con respecto al fago control antes (ronda 0) y después de las rondas de selección 1, 2 y 3. La unión del fago a la placa de microtitulación recubierta con LipH se determinó usando un anticuerpo anti-pVIII conjugado con peroxidasa y el sustrato HRP cromogénico mediante la medición de la absorbancia a 450 nm. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres medidas. (b,c) Selección mediante PCR de los fagémidos individuales obtenidos tras la ronda 2 de selección usando cebadores que flanquean el gen fusionado a la secuencia que codifica pIII. Para el fago que presenta VHH anti-LipH, se prevé un fragmento de 676 pb, para el fago control que contiene una secuencia que codifica una miniproteína más pequeña, se genera un fragmento de 394 pb. P: ADN fagémido del fagémido que presenta VHH anti-LipH que sirvió como control de PCR.

En la **figura 4** se muestra un ELISA de fagos de 64 clones individuales tras la selección mediante 3 CARD frente a la correspondiente diana. Se cubrieron placas de microtitulación con las correspondientes proteínas diana cetuximab, factor XIII y saglina, respectivamente. La unión del fago se detectó mediante la adición de anticuerpo anti-pVIII conjugado con peroxidasa usando el sustrato cromogénico de HRP TMB y la medición de la absorbancia a 450 nm. **Los clones seleccionados para la expresión como proteína soluble y la determinación de la K_d se marcan mediante un asterisco.** El valor medio de absorbancia que es indicativo de la no unión se determinó a partir de 10 de los clones de cada experimento con los valores de DO_{450} más bajos. Los clones que excedían de este valor al menos en un factor de 2,5 se consideraron posibles ligantes de la proteína diana y se mostraron como barras negras.

En la **figura 5** se muestra la estructura química de la biotina-tiramida.

En la **figura 6** se muestra (a) el esquema de los vectores de producción, que contienen las secuencias codificadoras de la oxidasa o la proteína diana, respectivamente con la secuencia de hélice genéticamente fusionada. (b) Gel nativo azul sin SDS que contiene la LipH-oxidasa (L+G, 160 kDa), LipH-hélice E (L, 55 kDa) y GOasa-hélice K (G, 70 kDa). El modelo ilustra el producto de conjugación formado.

En la **figura 7** se muestra un cromatograma GFC del producto de fusión resultante de GOasa-hélice K y LipH-hélice E.

En la **figura 8** se muestra un gel teñido con Coomassie para verificar el acoplamiento de ox. GOX a LipH. En las dos primeras filas se muestran los eductos (glucosa oxidasa 70 kDa, LipH 50 kDa). También se verificó la presencia del producto de interacción de 170 kDa resultante en la fila 3 mediante inmunotransferencia (no mostrado).

En la **figura 9** se muestra el ELISA de fagos de una selección 3 CARD simulada sin adición de biotina-tiramida (barras negras) o galactosa (barras grises), respectivamente. La selección se realizó como se ha descrito (véase «Validación del acoplamiento entre genotipo y fenotipo») con las mismas relaciones de la mezcla de fagos de unión y no unión. No se observó enriquecimiento de ligantes mediante ELISA de fagos o selección por PCR (0/10) después de tres rondas de selección de fagos por afinidad. pos: ELISA de fagos usando un fago anti-LipH que es capaz de unirse al pocillo recubierto con LipH. neg: unión de fondo de un fago que despliega una proteína no relacionada. La unión del fago a la placa de microtitulación recubierta con LipH se determinó usando un anticuerpo anti-pVIII conjugado con peroxidasa y la medición de la absorción a 450 nm de un sustrato cromogénico de HRP. Los experimentos se realizaron por triplicado.

En la **figura 10** se muestran los ELISA de fagos de 47 clones individuales de la biblioteca inicial. Según lo previsto, no se detectaron ligantes específicos para las proteínas diana saglina y cetuximab en las bibliotecas iniciales LibA y LibB. Como control positivo se utilizaron los fagos de unión a cetuximab y saglina ya seleccionados (último pocillo).

En la **figura 11** se muestra una selección de una única ronda de una biblioteca de fagos para ligantes de cetuximab. A: método de selección más avanzado, B: selección 3CARD. Los clones que proporcionaban señales de ELISA $>0,3$ se consideraron ligantes. A: 1 clon; B: 36 clones. DF: selección mediante despliegue de fagos clásica.

En la **figura 12** se muestra una selección de única ronda de una biblioteca de fagos para ligantes de LipH. A: método de selección más avanzado, B: selección 3CARD. Los clones que proporcionaban señales de ELISA $>0,2$ se consideraron ligantes. A: 0 clones; B: 2 clones. DF: selección mediante despliegue de fagos clásica.

5 En la **figura 13** se muestra la estructura de la biotina-tiramida (A) respectivamente, biotina-tiramida con puente disulfuro escindible (B).

En la **figura 14** se muestra la selección de una biblioteca de fagos para ligantes de CTLA4. Izquierda: utilizando biotina-tiramida; derecha: utilizando biotina-SS-tiramida. Los clones que proporcionaban señales de ELISA $>0,2$ se consideraron ligantes. Izquierda: 2 clones, derecha: 4 clones.

10 En la **figura 15** se muestra la selección de una biblioteca de fagos para ligantes de MreB. Izquierda: utilizando biotina-tiramida; derecha: utilizando biotina-SS-tiramida. Los clones que proporcionaban señales de ELISA $>0,15$ se consideraron ligantes. Izquierda: 2 clones, derecha: 8 clones.

15 En la **figura 16** se muestra la selección de una biblioteca de fagos para ligantes de tiorredoxina. Izquierda: utilizando biotina-tiramida; derecha: utilizando biotina-SS-tiramida. Los clones que proporcionaban señales de ELISA $>0,2$ se consideraron ligantes. Izquierda: 3 clones, derecha: 6 clones.

20 Los presentes inventores muestran que la selección de diversas bibliotecas puede acelerarse significativamente usando 3 CARD mediante la conversión de una interacción transitoria de un anticuerpo con su antígeno en un marcador permanente, es decir, el acoplamiento covalente de biotina a la superficie del fago o de las células microbianas. Esto se consiguió mediante la aplicación de una reacción enzimática acoplada sobre la superficie del fago o de la levadura, donde la oxidasa unida a la diana genera el H_2O_2 necesario para la peroxidasa unida al fago para activar el sistema biotina-tiramida. El sistema biotina-tiramida se ha utilizado ampliamente en inmunohistoquímica y también para el
25 marcaje selectivo de células que despliegan enzimas. Debido a su corta semivida en soluciones acuosas, el radical de tiramida formado por la enzima reacciona en el sitio de formación, lo que permite el depósito covalente de biotina específico del sitio (Bobrow y cols., 1989, 1991, 1992, Becker y cols., 2007, 2008, Lipovsek y cols. 2007).

30 Para que se produzca una correlación entre genotipo y fenotipo, la reacción de biotilación tiene que controlarse cuidadosamente y limitarse a la población de miembros raros de la biblioteca capaces de interactuar específicamente con una pareja de interacción predeterminada. Con este propósito se estableció una reacción enzimática acoplada donde la actividad de la HRP que forma el radical de tiramida se controla mediante la formación de peróxido de hidrógeno a través de una oxidasa. En este caso, el conjugado antígeno-oxidasa en solución está en gran exceso con respecto a las partículas de fago. No obstante, la producción de H_2O_2 en exceso requerida por la
35 HRP para activar la tiramida puede evitarse mediante la adición de una catalasa que degrada de forma eficaz y continua el peróxido de hidrógeno. Además, la reacción de acoplamiento se lleva a cabo a un pH subóptimo para la correspondiente oxidasa, lo que reduce adicionalmente el exceso de peróxido de hidrógeno. En consecuencia, solo las moléculas de HRP que están muy próximas a una oxidasa tienen la posibilidad de capturar una molécula de peróxido de hidrógeno antes de que sea descompuesta por la catalasa. En conjunto, el sistema adquiere varias capas
40 de seguridad para garantizar un marcaje con biotina selectivo de la diana unida al fago tanto haciendo accesible el H_2O_2 exclusivamente a la HRP sobre el fago de unión al antígeno como generando un radical tiramida que debido a su corta semivida actúa a nivel local.

45 Hasta donde saben los inventores, esta es la primera vez que se aplica una reacción enzimática acoplada a la selección mediante despliegue de fagos. McCafferty y colaboradores describieron hace más de una década una estrategia de enzima única para marcar permanentemente bacteriófagos de unión a diana. Esta se denominó «tecnología *pathfinder* (busca vías)» y se basa en la biotilación mediada por HRP de fagos que despliegan anticuerpos en un sitio específico de una superficie celular o una proteína diana (Osbourn y cols. 1998). En esta configuración experimental, la peroxidasa no se acopla directamente a las partículas de fago. De hecho, se utilizaba un ligando conjugado con peroxidasa de la proteína diana, por ejemplo, un anticuerpo que se une a la proteína diana
50 en un lugar diferente al sitio de unión del fago al anticuerpo. La colocalización del fago de unión a la diana y la HRP en la diana da lugar a la biotilación del fago. Este método se ha aplicado exclusivamente a proteínas diana expuestas en la superficie celular, lo que hace posible eliminar el exceso de conjugado peroxidasa-ligando y de partículas de fago no unida biotiladas o no mediante centrifugación celular y el lavado previo a la captura del fago mediante la unión a esferas recubiertas de estreptavidina. El método descrito en este documento puede aplicarse con éxito a la
55 selección de dianas solubles, debido a la biotilación cruzada fuertemente reducida de las partículas de fago que no son capaces de unirse a la proteína diana mediante la adición de catalasa que elimina el exceso de peróxido de hidrógeno, el sustrato de la peroxidasa.

60 La conversión de la interacción transitoria del ligante y la proteína diana en un marcaje de biotina covalente proporciona la ventaja importante de que pueden aplicarse condiciones de lavado muy rigurosas para la eliminación de los fagos unidos inespecíficamente a la matriz de adsorción. Hemos utilizado procedimientos de lavado exhaustivos que incluyen el uso de detergentes, así como una disminución del pH a 2,2 ya que se sabe que la interacción entre biotina y estreptavidina es estable en estas condiciones (Hofmann y cols. 1980). Cabe esperar que a pH bajo el complejo
65 proteína diana unida al fago se desnaturalice y, por tanto, se disocie, lo que puede ser beneficioso para la infección

por el fago de células de *E. coli*, lo que requiere una proteína pIII desenmascarada. Puesto que observamos que las partículas de fago que se unen a microesferas magnéticas pueden utilizarse directamente para la infección de bacterias no se intentó romper la interacción tan estable entre biotina y estreptavidina que permanece estable incluso a pH 2,2 ni desadsorber las partículas de fago de la matriz. El uso de un conjugado de biotina-tiramida con un enlazador escindible que permite la liberación selectiva del fago biotinilado de la matriz de estreptavidina puede reducir adicionalmente el fondo no deseado de fagos unidos inespecíficamente.

El procedimiento descrito en este documento produce ligantes de afinidad media. Este no fue inesperado puesto que ambas bibliotecas habían sido utilizadas ya para el aislamiento de VHH aplicando estrategias de despliegue de fagos convencionales (LibA) y despliegue en la superficie de levaduras (LibB) que dieron lugar a ligantes con afinidades similares (datos no mostrados). Asimismo, LibB deriva de llamas no inmunizadas que se espera que *per se* contengan un amplio repertorio de ligantes de afinidad baja y media debido a la falta de maduración de la afinidad *in vivo*. En la actualidad sigue sin dilucidarse a nivel experimental si la selección mediante despliegue de fagos ³CARD permite la discriminación entre ligantes de baja y alta afinidad y, por tanto, puede utilizarse para la selección de maduración de la afinidad. Puesto que la concentración de conjugado oxidasa-diana puede variar libremente, es posible seleccionar ligantes de alta afinidad a través de selección de afinidad mediante la reducción de una concentración objetivo o a través de selección por constantes de disociación baja (Hawkins, Russell 1992). Para la selección de afinidad, los fagos pueden mezclarse con cantidades pequeñas de antígeno conjugado con oxidasa soluble de modo que el antígeno esté en exceso con respecto al fago pero con la concentración del antígeno por debajo de la constante de disociación (K_d) del anticuerpo. A continuación, aquellos fagos unidos al antígeno se marcan mediante ³CARD y se aíslan mediante captura con microesferas magnéticas. Para la selección por constante de disociación baja, los anticuerpos pueden cargarse previamente con antígeno acoplado a la oxidasa y diluirse en un exceso de antígeno no conjugado antes de la captura de ³CARD en microesferas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina.

En conclusión, la estrategia descrita en este documento es especialmente útil para la selección inicial de bibliotecas de despliegue de fagos o microorganismos muy extensas que excedan de las 10^9 variantes diferentes donde es muy importante en las primeras rondas de selección enriquecer los ligantes diana raros frente a un gran fondo de fagos inespecíficos. La correlación entre genotipo y fenotipo a través de una reacción enzimática acoplada y deposición del marcador puede también aplicarse a la selección de bibliotecas que se despliegan en la superficie de células bacterianas y de levaduras con ramificaciones interesantes para futuras aplicaciones.

Los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos, pero no pretenden limitar de ninguna forma el alcance de la invención. Especialmente, en los ejemplos se presentan nuevas combinaciones específicas de diferentes realizaciones y en otras partes de la descripción de la presente invención siempre se contemplan incluso aunque no se mencionen específicamente.

Ejemplo 1: Conjugación de la oxidasa con la proteína diana

Se establecieron dos métodos de acoplamiento directo para la unión covalente de una oxidasa y la proteína diana. El primer esquema de conjugación se basa en el uso de la variante M1 de la galactosa oxidasa (GOasa) que puede expresarse en *E. coli* (Sun y cols. 2001). Para el acoplamiento de la proteína diana a la GOasa, se utilizó un procedimiento previamente establecido que se basaba en la formación de una hélice superenrollada entre la enzima y la proteína de interés. Para tal fin, la proteína diana y la oxidasa se dotan de una etiqueta carboxilo terminal de hexahistidina seguida de una secuencia de hélice superenrollada que contiene ácido glutámico (hélice E) o restos de lisina (hélice K), que se sabe forman heterodímeros compactos (Steinman y cols. 2010). La secuencia de la hélice E (EVSALEK)₅ se fusionó genéticamente con LipH y la secuencia de la hélice K (KVSALKE)₅ se fusionó al extremo carboxilo terminal de la galactosa oxidasa. Ambas proteínas se expresaron independientemente en *E. coli* y se purificaron. La formación del heterodímero se consiguió simplemente mezclando la oxidasa y LipH y se confirmó mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (**figuras 6, 7**). Para un método alternativo de conjugación se utilizó la glucosa oxidasa disponible en el mercado. Puesto que esta enzima está glucosilada, la conjugación con la proteína diana puede llevarse a cabo con facilidad mediante la oxidación con periodato de los restos terminales de azúcar seguida de la formación de una base de Schiff del aldehído resultante con un resto de lisina que reside en la superficie de la proteína diana (Greg T. Hermanson, 1996). Con este fin, se incubó la glucosa oxidasa de *Fusarium sp.* oxidada con un exceso molar de proteína LipH y la fusión se purificó de la oxidasa no conjugada mediante cromatografía de afinidad de quelatos metálicos utilizando la etiqueta de hexahistidina del resto de LipH (**figura 8**).

Ejemplo 2: Reacción enzimática acoplada sobre el fago

Para investigar si la peroxidasa de rábano picante (HRP) puede acoplarse a la superficie de fagos filamentosos sin interferencia negativa con la unión al antígeno, las partículas de fago que despliegan VHH anti-LIPH y los fagos control que despliegan un péptido no relacionado se incubaron con HRP oxidada y se purificaron mediante precipitación del fago en varias veces usando polietilenglicol. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubrieron con proteína diana LipH. La unión del fago recubierto de HRP que despliega un anticuerpo VHH anti-LipH al antígeno inmovilizado podía confirmarse mediante la medición de la actividad peroxidasa usando el sustrato cromogénico TMB (**figura 2a**). Como quedaba por dilucidar si podía producirse una reacción acoplada sobre la superficie del fago donde la oxidasa libera el peróxido de hidrógeno que necesita la HRP, se recubrió una placa de microtitulación con el conjugado LipH-GOasa. Se añadieron respectivamente fagos recubiertos de HRP que desplegaban VHH anti-LipH o un fago control

que desplegaba un antígeno no relacionado. Después del lavado y la adición de galactosa, podía detectarse actividad peroxidasa (**figura 2b**) lo que indicaba que había tenido lugar una reacción acoplada sobre el fago.

Ejemplo 3: Validación del acoplamiento entre genotipo y fenotipo

Para la validación del acoplamiento entre genotipo y fenotipo se mezclaron fagos que presentaban VHH anti-LipH con fagos control a una relación 1:10 000 y 1:100 000, respectivamente. Tras la conjugación con HRP y la adición del complejo LipH-GOasa se inició la reacción enzimática acoplada mediante la adición de galactosa, biotina-tiramida y catalasa. Tras 30 min de incubación, los fagos biotinilados se capturaron mediante su unión a microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Tras lavar exhaustivamente con PBS, PBS-Tween y tampón glicina pH 2,2, respectivamente, se usaron directamente las microesferas unidas a fago para infectar a células de *E. coli*. Se aplicaron dos rondas más del mismo procedimiento de selección y el enriquecimiento de fagos que presentaban VHH anti-LipH se verificó mediante análisis con ELISA de fagos y análisis mediante PCR. En ambas mezclas, tras una única ronda de selección se acumularon fagos de unión a diana en un grado significativo (**figura 3a**). El análisis mediante PCR de los clones individuales tras 2 rondas de selección mostró que 6 de los 16 clones de la dilución 1:10 000 y 3 de los 16 clones de la dilución 1:100 000 contenían un fragmento de 676 pb, lo que es indicativo de la presencia del gen VHH. Este experimento de mezcla se repitió varias veces con resultados similares para optimizar el protocolo del método y garantizar su reproducibilidad. El enriquecimiento depende de la presencia tanto de biotina-tiramida como de galactosa (**figura 9**).

Ejemplo 4: Selección de la biblioteca VHH ³CARD

Para investigar si la selección de despliegue de fagos ³CARD puede usarse para la selección rápida de ligantes del antígeno a partir de una biblioteca de fagos, se utilizaron dos bibliotecas de despliegue de fagos de VHH de camélido. LibA contiene aproximadamente 10⁸ variantes de cadenas variables pesada de camélido con secuencias de lazo hipervariables aleatoriamente variegadas (Habicht y cols. 2007). LibB es una biblioteca del dominio VHH no expuesto al antígeno (3 x 10⁹ clones) que se obtuvo mediante clonación del repertorio de VHH de 12 llamas no inmunizadas dentro del vector de despliegue de fagos pAK200 usando procedimientos publicados (Monegal y cols. 2009). Se acoplaron tres proteínas diana diferentes con la glucosa oxidasa que se utilizaron para la selección, en concreto cetuximab, un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (Robert y cols. 2001), saglina, una proteína de las glándulas salivales de *Anopheles* que está implicada en el proceso de invasión de los mosquitos por los esporozoitos de *Plasmodium*, el agente causante del paludismo (Okulate y cols. 2007) y factor XIII, transglutaminasa humana que participa en la coagulación de la sangre (Komaromi y cols. 2010). Tras 1 o 2 rondas de selección, se generaron fagos a partir de 64 clones individuales y se comprobó su unión a la proteína diana mediante ELISA de fagos, lo que indicaba una acumulación de clones de fagos que se unen a la diana para las tres dianas (**figura 4**).

La secuencia codificadora de un ligante putativo para cada selección se transfirió al vector de expresión pEX y se produjo y purificó la proteína VHH correspondiente a partir del lisado de células de *E. coli*. La interacción con la correspondiente proteína diana se verificó mediante interferometría de biocapa y se obtuvieron constantes de disociación en el intervalo nanomolar medio (**tabla 1**) que corroboraban la idea de que el esquema de selección es suficientemente sólido para obtener anticuerpos de dominio único a partir de diferentes bibliotecas frente a varias dianas no relacionadas en una o dos rondas de selección. No se ha intentado eliminar la oxidasa, peroxidasa o ligantes de proteínas de fagos de la biblioteca de fagos inicial antes de la selección que pueden suponer una fracción significativa de la población de fagos seleccionada.

Tabla 1 Constantes de disociación (K_d) de los VHH obtenidas a partir de la selección ³CARD

Antígeno diana	Rondas de selección	K_d (nM)	Biblioteca	N.º de clones positivos
Cetuximab	2	156	LibA + LibB	8/32 + 12/32
Factor XIII	1	235	LibB	5/64
Saglina	1	90	LibB	4/64

Ejemplo 5: Conjugación de la oxidasa con el antígeno a través de la formación de una hélice superenrollada

Para obtener un heterodímero de oxidasa y antígeno diana, se expresó LipH de *P. aeruginosa* en *E. coli* con una etiqueta C-terminal de hexahistidina seguida de una secuencia codificadora de la hélice ácida (EVSALKE)₅ (Steinmann y cols. 2010). Del mismo modo, se dotó a la galactosa oxidasa M1 con una etiqueta de purificación de la hexahistidina C-terminal seguida de (KVSALKE)₅. Ambas proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de quelatos metálicos y se mezclaron en una relación molar 1:1 antes de su uso en experimentos de selección.

Ejemplo 6: Oxidación con periodato sódico

Se diluyeron 18,8 mg de periodato sódico (87,8 μ mol, Sigma) en 1 ml de H₂O. La proteína que se iba a oxidar, HRP o glucosa oxidasa (Sigma), se diluyó en H₂O hasta una concentración final de 10 mg/ml. Para la oxidación se mezclaron 200 μ l de solución de proteína con 20 μ l de la solución stock de periodato sódico. Después de 20 min de incubación a TA en oscuridad, la mezcla de reacción se purificó mediante una columna PD10 (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón de borato sódico 100 mM, pH 9,1. Se completaron 1,4 ml del eluido que contenían la proteína oxidada hasta 2 ml con tampón de borato sódico y se conservaron en alícuotas a -20 °C.

Ejemplo 7: Acoplamiento de la proteína diana con glucosa oxidasa

Se incubaron 0,1 mg de glucosa oxidasa oxidada con periodato a una concentración de 1 mg/ml con una cantidad equimolar o inferior equivalente de la proteína diana en 200 µl de tampón a temperatura ambiente en oscuridad durante 180 min seguido de cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex 75 pg 16/60 o Superdex 200 pg 16/60, respectivamente, y se recogió la fracción de elución temprana.

Etapa crítica: La formación del conjugado debe comprobarse mediante electroforesis nativa en gel o mediante cromatografía de filtración en gel. Puesto que los rendimientos de conjugado heterodimérico pueden variar dependiendo del número de restos de lisina accesibles sobre la superficie de la proteína diana, generalmente se recomienda purificar el producto de conjugación mediante cromatografía de filtración en gel usando una columna de Sepharosa o Superdex y recogiendo las fracciones de elución tempranas.

Ejemplo 8: Acoplamiento de HRP al fago M13

Antes de acoplar la HRP, los ligantes de estreptavidina se eliminaron de la biblioteca de fagos. Con este fin, se incubaron 100 µl de fagos pAK200-VHH (3×10^{10} fagos) con 10 µl de Dynabeads acopladas con estreptavidina (T1, Invitrogen) durante 30 min a TA a 40 rpm en un agitador. Tras la separación de las microesferas usando un concentrador magnético de partículas, el sobrenadante se transfirió a un tubo de reacción de 1,5 ml y se añadieron 100 µl de HRP oxidada (2 mg/ml en tampón borato pH 9,1). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación lenta durante 45 minutos. Para eliminar la HRP no conjugada se añadieron 200 µl de tampón de precipitación de fagos (PEG 6000 al 20 %, NaCl 1,5 M) seguido de la incubación en hielo durante 45 min. Tras la centrifugación en una centrífuga de mesa (30 min), el sedimento de fagos se disolvió en 50 µl de PBS.

Ejemplo 9: Reacción enzimática acoplada sobre el fago

Se añadieron 5 µl (3 pMol) de conjugado antígeno-oxidasa a 50 µl de suspensión de fagos conjugados con HRP y se incubó durante 90 min a 4 °C con agitación ligera. A continuación, el volumen de reacción se elevó a 500 µl mediante la adición de tampón PBS. Cuando se utilizó GOasa como enzima indicadora, el pH se ajustó a 9,1 mediante la adición de tampón borato. A continuación, se añadieron 1 µl de catalasa (2 mg/ml) y 2,5 µl de solución stock de biotina-tiramida (11,5 µM). La reacción enzimática se inició mediante la adición de 10 µl de glucosa 10 mM o 10 µl de galactosa 10 mM, respectivamente. La mezcla de reacción se incubó durante 15 min a TA en oscuridad y se detuvo mediante la adición de 200 µl de catalasa (2 mg/ml). Después de tres minutos, se añadieron 700 µl de tampón de precipitación de fagos y la mezcla se incubó en hielo durante 45 min. El sedimento de fagos se recogió mediante precipitación en una centrífuga de mesa (20 min, 4 °C) y se resuspendió en 200 µl de PBS.

Etapa crítica: Es esencial reducir la actividad de la oxidasa llevando a cabo la reacción a un pH no óptimo para la correspondiente oxidasa. Con este fin, la reacción enzimática acoplada sobre el fago debe realizarse en tampón borato a pH 9,1, cuando se utiliza la GOasa, que está muy por encima del pH óptimo de la enzima (pH 7,0) para ralentizar la reacción enzimática y evitar la producción de un exceso de peróxido de hidrógeno. En el caso de la glucosa oxidasa, el pH óptimo es 5,5 por lo que la reacción debe llevarse a cabo en PBS a pH 7,4. También es importante añadir catalasa que destruye el exceso de peróxido de hidrógeno producido por la oxidasa que no está unida al fago, que de otro modo puede difundirse lejos del lugar de formación y actuar como sustrato para la peroxidasa localizada en las proximidades de las partículas de fago.

Ejemplo 10: Captura de fagos biotinilados

Se añadieron 20 µl de microesferas magnéticas acopladas con estreptavidina (Dynabeads T1, Invitrogen) a la mezcla y se incubaron mediante agitación durante 30 min. A continuación, las microesferas se lavaron cinco veces con 200 µl de tampón PBS. Se utilizó un colector magnético de partículas para separar las esferas del sobrenadante. Posteriormente las microesferas recogidas se resuspendieron en 200 µl de tampón PBS y se transfirieron a un tubo nuevo para eliminar los posibles complejos anticuerpo-fago unidos al plástico. Las microesferas se recogieron y resuspendieron en 200 µl de glicina-HCl 10 mM pH 2,2 y se incubaron durante 8 min para eliminar los fagos unidos de manera inespecífica a las microesferas. Este procedimiento se repitió una vez. Finalmente, las microesferas se lavaron cinco veces usando tampón PBS Tween (Tween 20 al 0,05 % en tampón PBS) y cinco veces con tampón PBS.

Ejemplo 11: Infección de células de *E. coli*

Después de la primera etapa de lavado, las microesferas recubiertas de estreptavidina con fagos unidos se resuspendieron en 200 µl de PBS y se utilizaron para la infección de *E. coli* ER 2738 mediante dilución en 20 ml de cultivo líquido bacteriano a una DO_{600} de 0,5 y se incubaron durante 30 min a 37 °C sin agitación. Las células se recogieron mediante centrifugación, se disolvieron en 1,5 ml de PBS y se sembraron en alícuotas de 500 µl sobre placas de agar que contenían cloranfenicol (25 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Ejemplo 12: Métodos generales para la producción de fagos

La cepa ER2738 de *E. coli* (Gough 1983, Woodcock 1989) que contenía el fagémido pAK200-VHH se creció hasta una DO_{600} de 0,1 en 50 ml de dYT (CM a 25 µg/ml, TET a 100 µg/ml) a 37 °C (agitación a 200 rpm) y se añadieron 10 µl de fago auxiliar M13VCS. La infección se llevó a cabo incubando las células durante 45 minutos a 37 °C. Se añadió kanamicina (75 µg/ml) y el cultivo se incubó a 37 °C (200 rpm) hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,5. A

continua⁵ción se añadieron 50 µl de IPTG 1 M para la inducción de la síntesis de VHH-pIII y la incubación se continuó durante 12 h a 28 °C. Los fagos producidos se recogieron mediante precipitación de fagos. Con este fin, las células se recogieron mediante centrifugación (3200 g, 12 min, 4 °C) y se transfirieron 35 ml del sobrenadante a un tubo tipo Falcon de 50 ml para alta velocidad. Se añadieron 8 ml de tampón de precipitación de fagos (PEG 6000 al 20 %, NaCl 1,5 M) y la mezcla se incubó durante 4 horas en hielo. Los fagos precipitados se recogieron mediante centrifugación (20 200 g, 4 °C, 30 min). El sedimento de fagos resultante se disolvió en 1,6 ml de PBS y los fagos se precipitaron de nuevo mediante la adición de 400 µl de tampón de precipitación mediante incubación durante 10 min a 4 °C. Tras la centrifugación (16 000 g, 10 min, TA) el sedimento de fagos restante se disolvió en 1 ml de PBS. El título de fagos se determinó mediante infección de ER2738 con una dilución seriada de partículas de fago o espectrométricamente mediante determinación de la DO₃₂₀ y DO₂₆₉ (Smith, Scott 1993). Los fagos se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.¹⁰

Tabla 2 Título de fagos de las VHH obtenidas a partir de la selección ³CARD.

Antígeno diana	Biblioteca	Ronda	Fagos iniciales	Recuento de infección	Recogido (%)
Cetuximab	LibA	1	3·10 ¹¹	8,4·10 ⁶	0,0028
		2	1·10 ¹⁰	2,4·10 ⁶	0,024
Factor XIII	LibB	1	1·10 ¹²	9,5·10 ⁵	0,000095
Saglina	LibA	1	5·10 ¹¹	1,9·10 ⁴	0,0000038
Saglina	LibB	1	1·10 ¹²	1,9·10 ⁴	0,0000019

Antígeno diana	Biblioteca	Ronda	Fagos iniciales (a)	Recuento de infección (b)	Relación (a/b)
Cetuximab	LibA	1	3·10 ¹¹	8,4·10 ⁶	3,6·10 ⁴
		2	1·10 ¹⁰	2,4·10 ⁶	4,2·10 ³
Factor XIII	LibB	1	1·10 ¹²	9,5·10 ⁵	1,1·10 ⁶
Saglina	LibA	1	5·10 ¹¹	1,9·10 ⁴	2,6·10 ⁷
Saglina	LibB	1	1·10 ¹²	1,9·10 ⁴	5,2·10 ⁷

Ejemplo 13: Síntesis de biotina-tiramida
 Se diluyeron 10 mg (17,96 µmol) de Sulfo-NHS-LC-biotina (Thermo Scientific) en 800 µl de DMF seca y se mezclaron con una solución de 2 mg (11,51 µmol) de tiramida (Sigma-Aldrich) en 200 µl de DMF seca. A continuación se añadieron 3 µl de trietilamina y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a TA. Para amortiguar el exceso remanente de Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce) se añadieron 20 µl de 1-propilamina a la solución. Tras 4 h de incubación a TA, el producto resultante se conservó a -20 °C sin purificación adicional. La formación de biotina-tiramida se confirmó mediante HPLC y CL-EM. La estructura química de la biotina-tiramida es muestra en la figura 5.¹⁵

Ejemplo 14: Comparación con el método de despliegue de fagos más avanzado
 Para demostrar que el método de selección de bibliotecas de fagos de la presente invención es superior al método de selección más avanzado, se realizaron en paralelo una selección clásica y una selección ³CARD usando condiciones de selección idénticas. Dianas: cetuximab y LipH (las dianas ya se han descrito en la invención, así como en la metodología de selección). La selección ³CARD se llevó a cabo como se ha descrito para una ronda de selección. Para la selección clásica se utilizó la proteína diana biotinilada a la misma concentración que para ³CARD (4,5 nM). La biblioteca de fagos se incubó con la proteína diana biotinilada a TA. Después de 20 min, los fagos unidos a la diana se capturaron mediante microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina (15 min). Tras lavar las microesferas 10 veces con 1 ml de TPBS, el resto de los fagos unidos se eluyeron con tampón de glicina pH 2,2 y se utilizaron para la infección de células de *E. coli*. Tras una ronda de selección, los fagos se prepararon a partir de 96 clones individuales y se comprobó su capacidad para unirse a la correspondiente proteína diana usando un ELISA de fagos. Los resultados se muestran en las figuras 11 y 12.²⁰

Ejemplo 15: Realización preferida adicional de la tecnología ³CARD
 Como nuevo compuesto para marcaje de fagos de unión a diana se utilizó un derivado de biotina-tiramida que contenía un puente disulfuro entre el resto de biotina y el de tiramida de la molécula de unión. En consecuencia, a partir del fago marcado se puede escindir el resto de biotina mediante la adición de un agente reductor débil, como por ejemplo ditiotreitól.²⁵

Síntesis de biotina-tiramida

Se diluyeron 10 mg (17,96 µmol) de Sulfo-NHS-LC-biotina, respectivamente Sulfo-NHS-SS- biotina (Thermo Scientific) en 800 µl de DMF seca y se mezclaron con una solución de 2 mg (11,51 µmol) de tiramida (Sigma-Aldrich) en 200 µl de DMF seca. A continuación se añadieron 3 µl de trietilamina y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a TA. Para amortiguar el exceso remanente de Sulfo-NHS-LC-biotina, respectivamente Sulfo-NHS-SS-botina, se añadieron 20 µl de 1-propilamina a la solución. Tras 4 h de incubación a TA, el producto resultante se conservó a -20 °C sin purificación adicional. La formación de biotina-tiramida se confirmó mediante HPLC y CL-EM.³⁰

Se realizaron tres selecciones adicionales para los fagos de unión a diana usando esta nueva molécula de marcaje. Como proteínas diana, se utilizaron la proteína MreB de *E. coli*, el dominio extracelular del CTLA4 (antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos) humano y tiorredoxina.

- 5 Para la selección de la biblioteca de fagos, se utilizó la misma biblioteca de fagos como ya se ha descrito. También se realizó el acoplamiento oxidasa-diana como se ha descrito. Tras el marcaje de los fagos, los fagos biotinilados se capturaron mediante microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Tras lavar exhaustivamente, los fagos capturados se utilizaron directamente para la infección de células de *E. coli* en caso de utilizar biotina-tiramida (figuras 14-16, panel izquierdo). En el caso de los fagos que se marcaron usando biotina-SS-tiramida, las partículas de fago unidas a las microesferas magnéticas se escindieron mediante la adición de ditiotreititol 50 mM como agente reductor. A continuación, los fagos eluidos se utilizaron para infectar células de *E. coli*. Para cada selección, los fagos se prepararon a partir de 96 clones únicos y se comprobó su capacidad para unirse a la respectiva proteína diana usando un ELISA de fagos.
- 10
- 15 Las selecciones proporcionan fagos de unión a diana ya después de una única ronda de selección. Usando el sustrato mejorado y el procedimiento de aislamiento de fagos mejorado, el número de candidatos positivos aumentaba a un número mayor.

Bibliografía

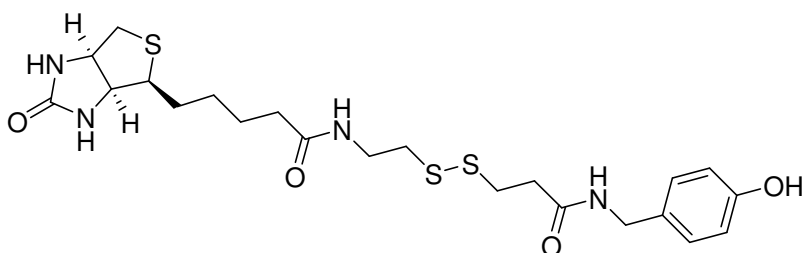
- 20 Bayer, E.A., Ben-Hur, H., Gitlin, G. & Wilchek, M. (1986): An improved method for the single-step purification of streptavidin. *J Biochem Biophys Methods*. 13: 103-112.
- 25 Becker, S., Michalczyk, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E. & Kolmar, H. (2007): Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *Chembiochem*. 8: 943-949.
- Becker S, Höbenreich H, Vogel A, Knorr J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE, Reetz MT, Kolmar H. (2008) Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 47(27):5085-8.
- 30 Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J. & Litt, G.J. (1989): Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. 125: 279-285.
- Bobrow, M.N., Litt, G.J., Shaughnessy, K.J., Mayer, P.C. & Conlon, J. (1992): The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J Immunol Methods*. 150: 145-149.
- 35 Bobrow, M.N., Shaughnessy, K.J. & Litt, G.J. (1991): Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods*. 137: 103-112.
- 40 Bradbury AR, Sidhu S, Dübel S, McCafferty J. (2011) Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. *Nat Biotechnol*. 29:245-54.
- Brockmann, E.C., Akter, S., Savukoski, T., Huovinen, T., Lehmusvuori, A., Leivo, J., Saavalainen, O. et al. (2011): Synthetic single-framework antibody library integrated with rapid affinity maturation by VL shuffling. *Protein Eng Des Sel*. 24: 691-700.
- 45 Derda, R., Tang, S.K., Li, S.C., Ng, S., Matochko, W. & Jafari, M.R. (2011): Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. *Molecules*. 16: 1776-1803.
- 50 Gitlin, G., Bayer, E.A. & Wilchek, M. (1990): Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. Tyrosine residues are involved in the binding site. *Biochem J*. 269: 527-530.
- Gough et al. (1983): Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *Journal of Molecular Biology* 166: 1-9.
- 55 Green, N.M. (1975): Avidin. *Adv Protein Chem*. 29: 85-133.
- Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R.P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J., Wieligmann, K. et al. (2007): Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 19232-19237.
- 60 Hawkins, R.E., Russell, S.J. & Winter, G. (1992): Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol*. 226: 889-896.
- Hermanson, G.T. *Bioconjugation techniques*. (Academic Press, 1996).

- Hofmann, K., Wood, S.W., Brinton, C.C., Montibeller, J.A. & Finn, F.M. (1980): Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77: 4666-4668.
- 5 Hoogenboom, H.R. (2005): Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol.* 23: 1105-1116.
- Komaromi, I., Bagoly, Z. & Muszbek, L. (2010): Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 9: 9-20.
- 10 Li, W. & Caberoy, N.B. (2010): New perspective for phage display as an efficient and versatile technology of functional proteomics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 909-919.
- Lipovsek D, Antipov E, Armstrong KA, Olsen MJ, Klihanov AM, Tidor B, Wittrup KD. (2007) Selection of horseradish peroxidase variants with enhanced enantioselectivity by yeast surface display. *Chem Biol.* 14(10):1176-85.
- 15 Liu, Y., Adams, J.D., Turner, K., Cochran, F.V., Gambhir, S.S. & Soh, H.T. (2009): Controlling the selection stringency of phage display using a microfluidic device. *Lab Chip.* 9: 1033-1036.
- Monegal, A., Ami, D., Martinelli, C., Huang, H., Aliprandi, M., Capasso, P., Francavilla, C., Ossolengo, G. & de Marco, A. (2009): Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library. *Protein Eng Des Sel.* 22: 273-280.
- 20 Okulate, M.A., Kalume, D.E., Reddy, R., Kristiansen, T., Bhattacharyya, M., Chaerkady, R., Pandey, A. & Kumar, N. (2007): Identification and molecular characterization of a novel protein Saglin as a target of monoclonal antibodies affecting salivary gland infectivity of Plasmodium sporozoites. *Insect Mol Biol.* 16: 711-722.
- 25 Pepper LR, Cho YK, Boder ET, Shusta EV. (2008) A decade of yeast surface display technology: where are we now? *Comb Chem High Throughput Screen.* 11(2):127-34.
- Osborn, J.K., Derbyshire, E.J., Vaughan, T.J., Field, A.W. & Johnson, K.S. (1998): Pathfinder selection: in situ isolation of novel antibodies. *Immunotechnology.* 3: 293-302.
- 30 Osborn, J.K., Earnshaw, J.C., Johnson, K.S., Parmentier, M., Timmermans, V. & McCafferty, J. (1998): Directed selection of MIP-1 alpha neutralizing CCR5 antibodies from a phage display human antibody library. *Nat Biotechnol.* 16: 778-781.
- 35 Robert, F., Ezekiel, M.P., Spencer, S.A., Meredith, R.F., Bonner, J.A., Khazaeli, M.B., Saleh, M.N. et al. (2001): Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 19: 3234-3243.
- 40 Rothe, C., Urlinger, S., Lohning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jager, U., Hubner, B. et al. (2008): The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *J Mol Biol.* 376: 1182-1200.
- Smith, G.P. (1985): Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 228: 1315-1317.
- 45 Steiner, D., Forrer, P. & Pluckthun, A. (2008): Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J Mol Biol.* 382: 1211-1227.
- 50 Steinmann, B., Christmann, A., Heiseler, T., Fritz, J. & Kolmar, H. (2010): In vivo enzyme immobilization by inclusion body display. *Appl Environ Microbiol.* 76: 5563-5569.
- Sun, L., Petrounia, I.P., Yagasaki, M., Bandara, G. & Arnold, F.H. (2001): Expression and stabilization of galactose oxidase in *Escherichia coli* by directed evolution. *Protein Eng.* 14: 699-704.
- 55 van Bloois E, Winter RT, Kolmar H, Fraaije M.W. (2011) Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 29(2):79-86.
- Vodnik, M., Zager, U., Strukelj, B. & Lunder, M. (2011): Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules.* 16: 790-817.
- 60 Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H. & Jaeger, K.E. (2007): Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *ChemBiochem.* 8: 55-60.

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. & Graham, M.W. (1989): Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17: 3469-3478.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento de entidades de replicación marcadas específicamente, comprendiendo dicho método
- proporcionar en una mezcla de reacción un conjunto de entidades de replicación que despliegan variantes de una molécula receptora sobre su superficie y que tienen una primera o segunda enzima unida a dicha superficie, comprendiendo la mezcla de reacción una tercera enzima capaz de descomponer el exceso de producto de dicha primera y/o segunda enzima, siendo la primera enzima una peroxidasa, siendo la segunda enzima una oxidasa y siendo la tercera enzima una catalasa,
 - añadir a la mezcla de la etapa a) moléculas de ligando que están unidas a dicha primera enzima si dichas entidades están unidas a dicha segunda enzima, o dichos ligandos están unidos a dicha segunda enzima si dichas entidades están unidas a dicha primera enzima,
 - añadir a la mezcla de reacción un sustrato para la segunda enzima, siendo utilizado el sustrato por dicha segunda enzima en una reacción enzimática para producir un producto que es utilizado por dicha primera enzima para convertir un cosustrato de dicha primera enzima en una molécula marcadora reactiva que se une físicamente a la correspondiente entidad de replicación, marcando específicamente de este modo la entidad de replicación, y
 - aislar las entidades de replicación marcadas específicamente, y
 - en el que el cosustrato de dicha primera enzima es una tiramida conjugada con una molécula marcadora mediante un enlazador escindible, preferiblemente un puente disulfuro o una secuencia peptídica que puede ser escindida por una proteasa, preferiblemente una biotina-tiramida con un puente disulfuro escindible de la siguiente estructura:



- Método según la reivindicación 1, en el que la entidad de replicación se selecciona entre el grupo compuesto por un fago, un fagémido o una célula.
- Método según la reivindicación 2, en el que la entidad de replicación es una célula de levadura, preferiblemente de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Método según la reivindicación 1, siendo el sustrato de la segunda enzima glucosa y siendo el producto H_2O_2 .
- Método según la reivindicación 1, siendo la molécula marcadora biotina (2,4)-dinitrofenilo, fluoresceína o derivados de digoxigenina.
- Método según la reivindicación 1, siendo la molécula marcadora biotina, y llevándose a cabo la etapa de aislamiento d) mediante cromatografía de afinidad sobre una matriz de avidina o estreptavidina.
- Método según la reivindicación 1, siendo la molécula marcadora fluoresceína o una avidina o estreptavidina fluorescentes unidas a biotina y llevándose a cabo la etapa de aislamiento d) mediante separación de células activada por fluorescencia.
- Método según la reivindicación 1, en el que la molécula marcadora es biotina y el aislamiento comprende la separación magnética de células en partículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina o avidina unidas a la entidad marcada con biotina.

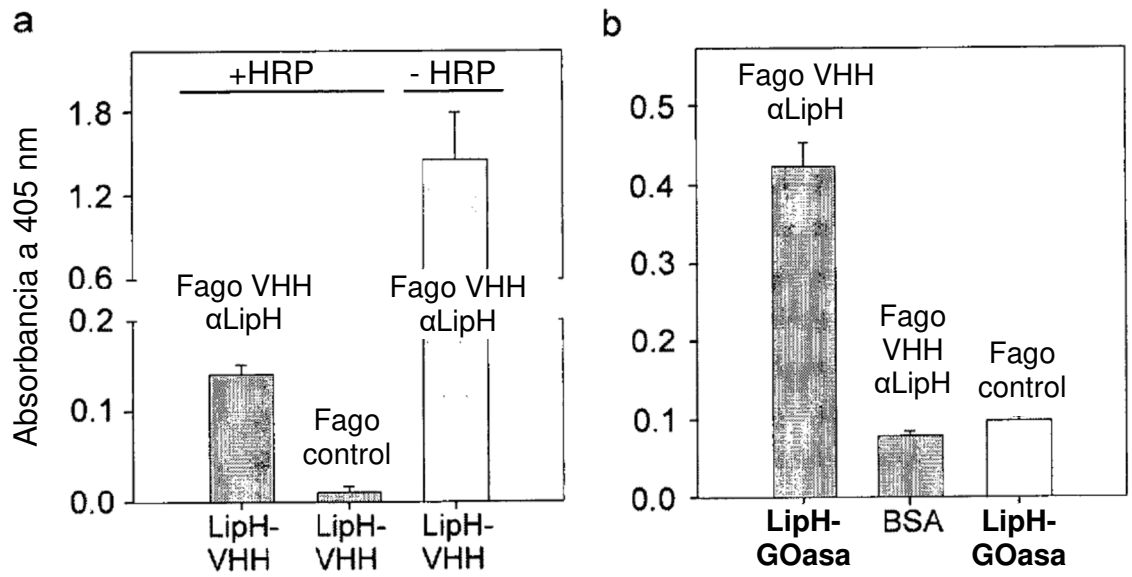


Figura 2

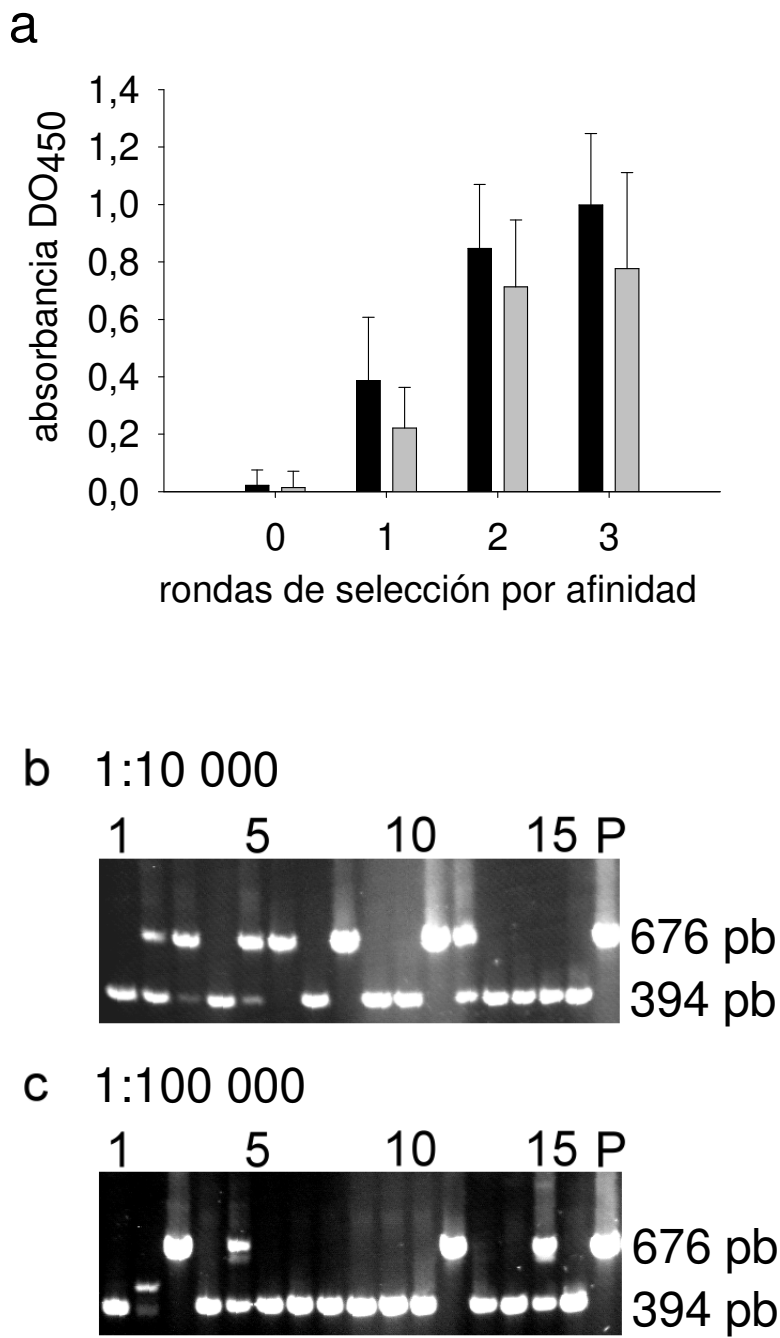


Figura 3

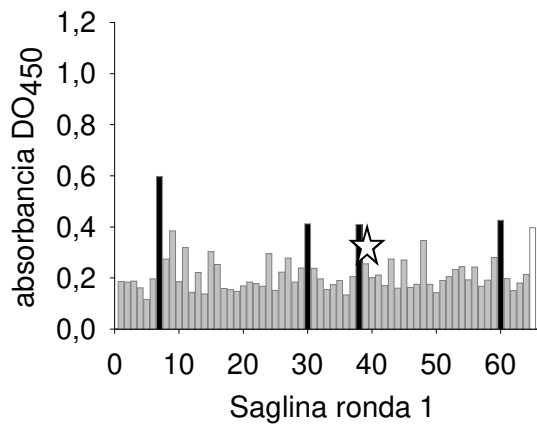
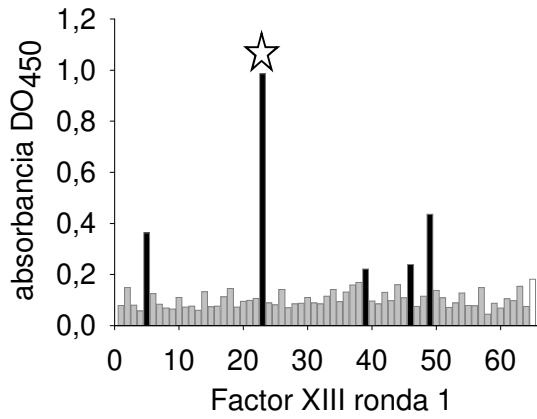
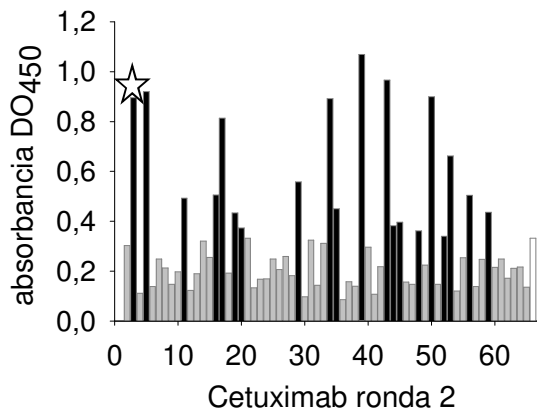


Figura 4

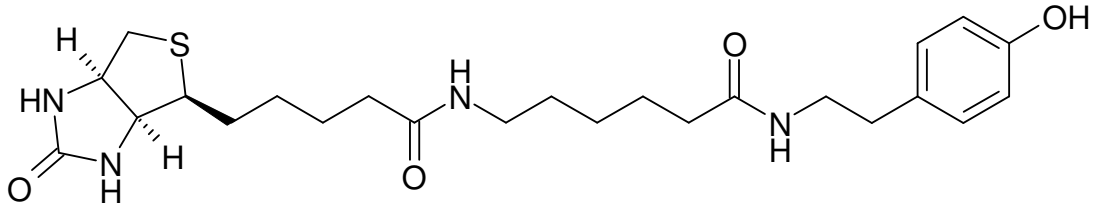


Figura 5

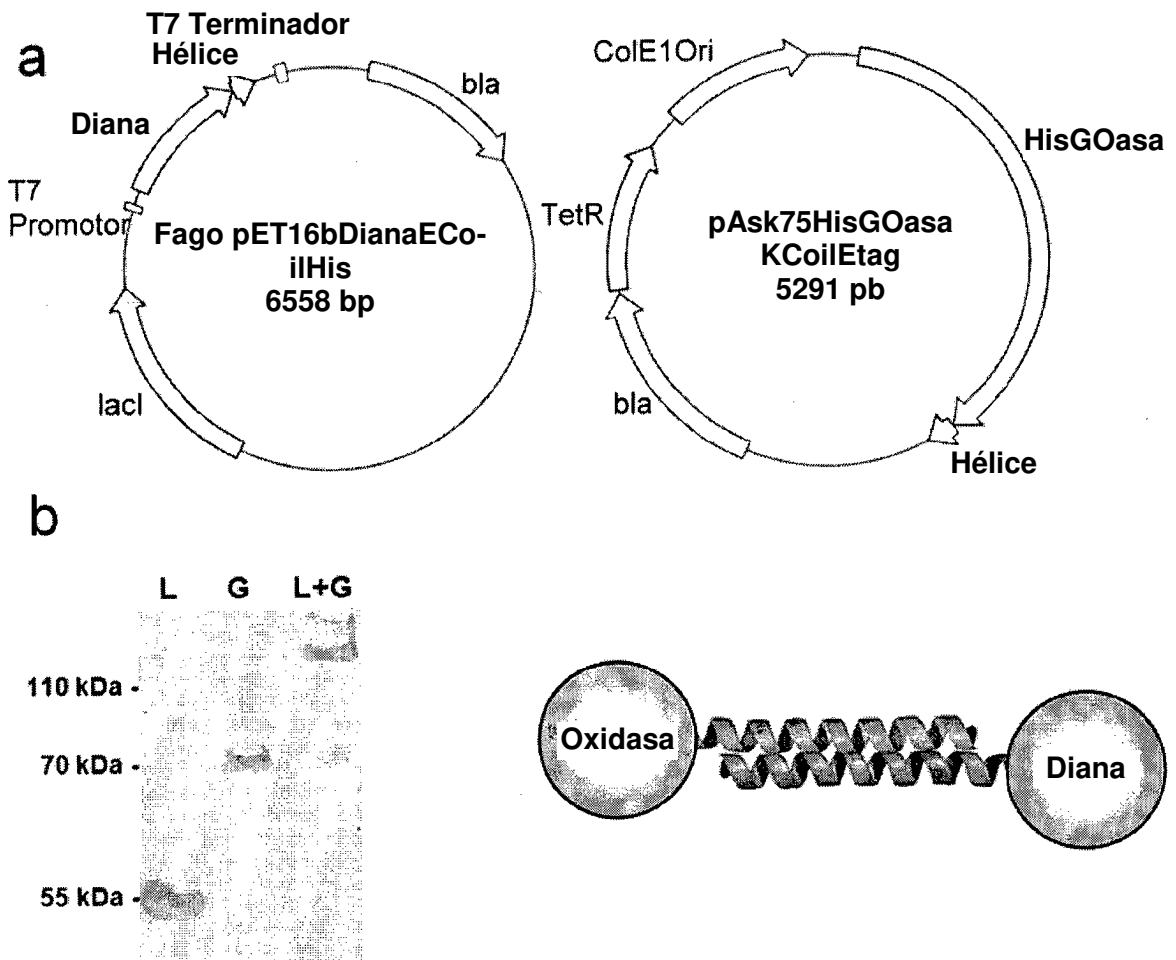


Figura 6

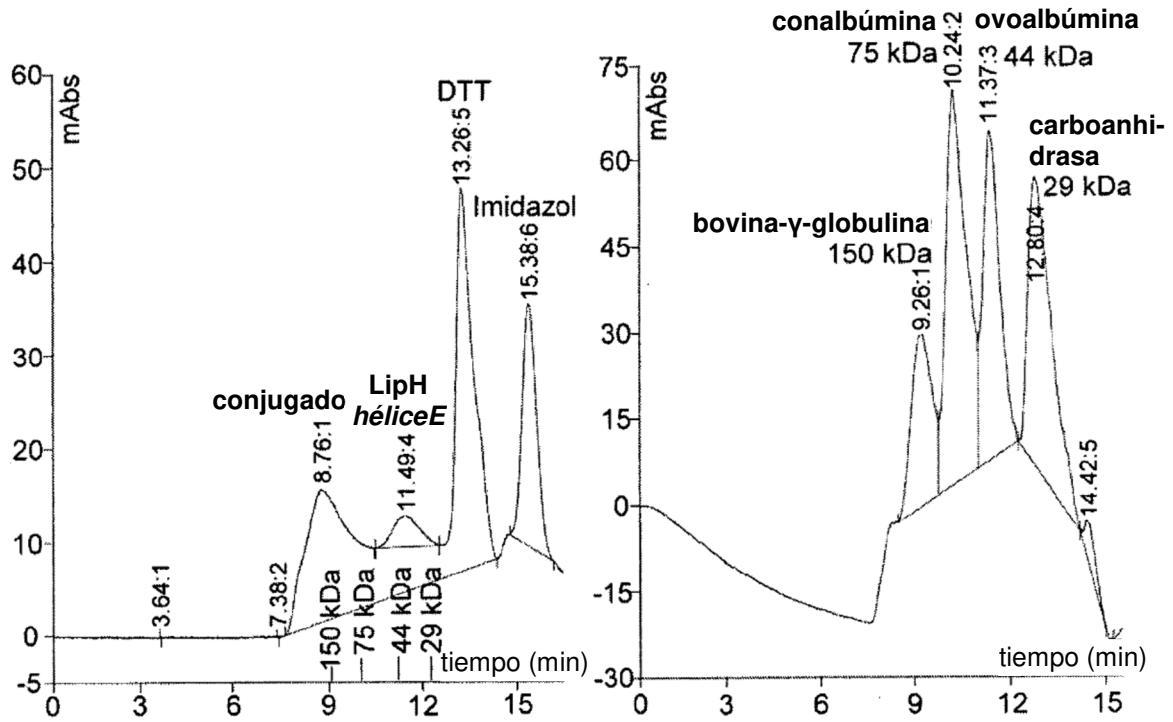


Figura 7

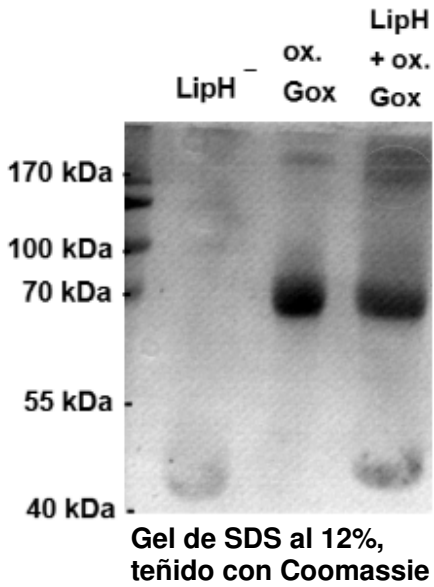


Figura 8

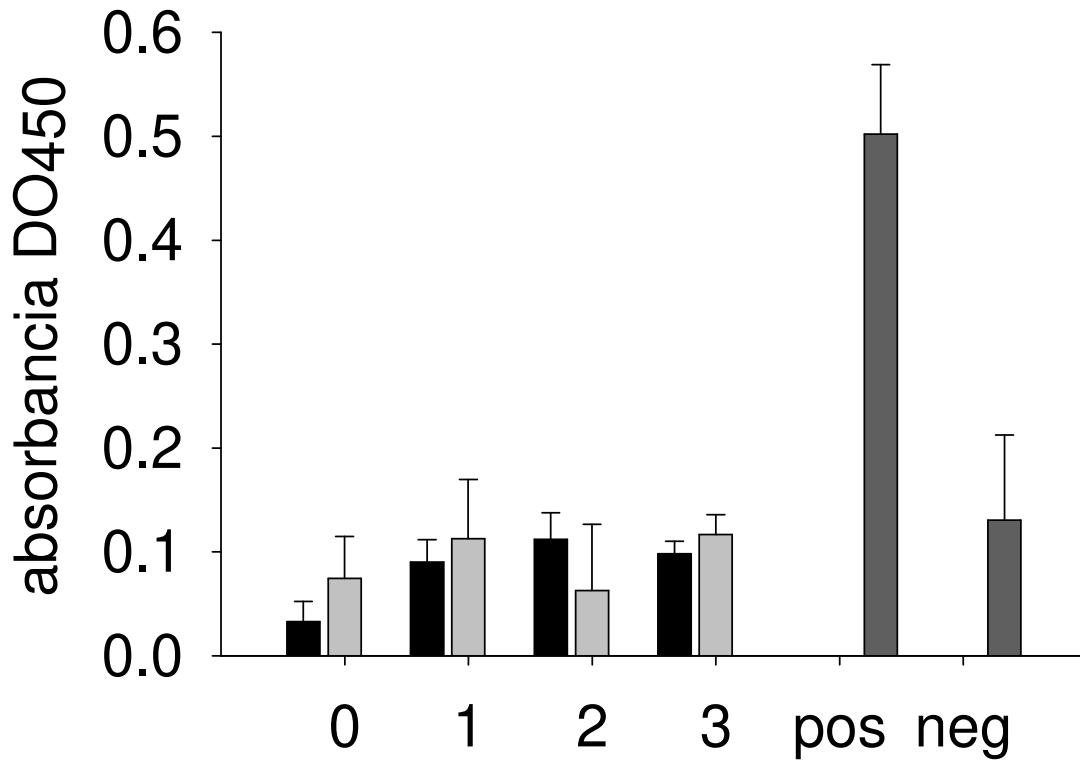


Figura 9

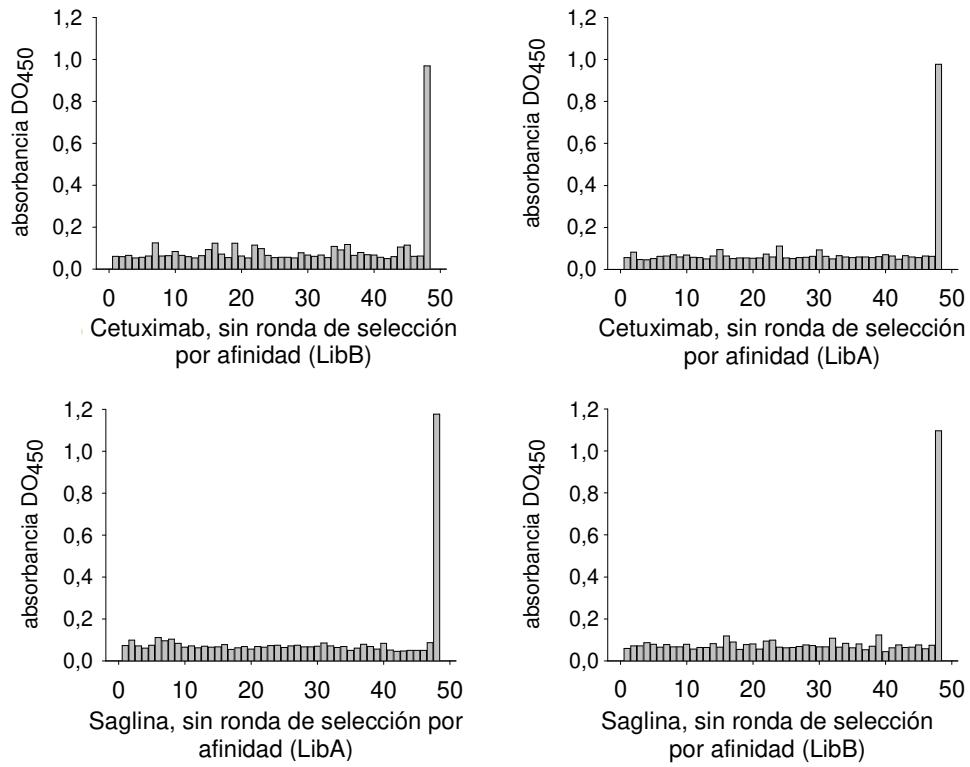
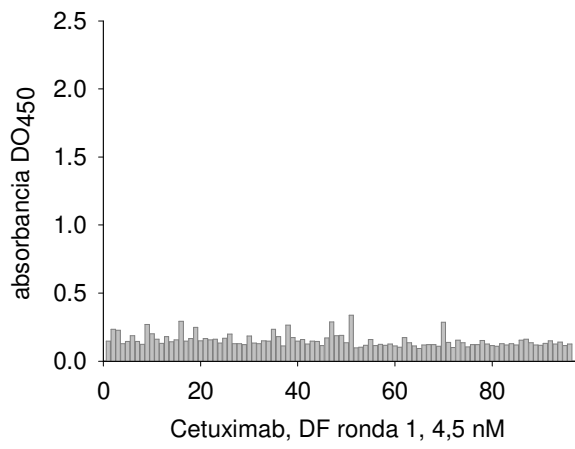


Figura 10

A



B

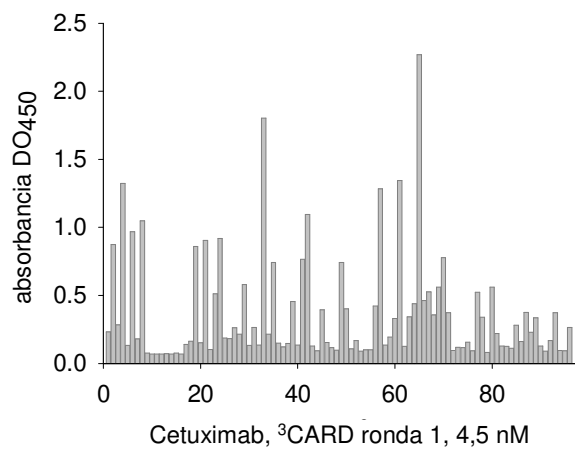
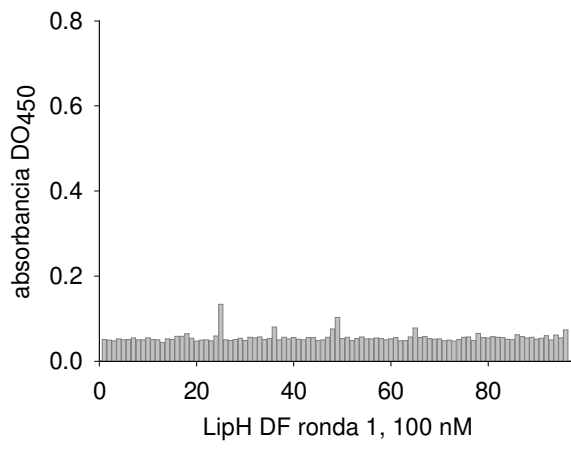


Figura 11

A



B

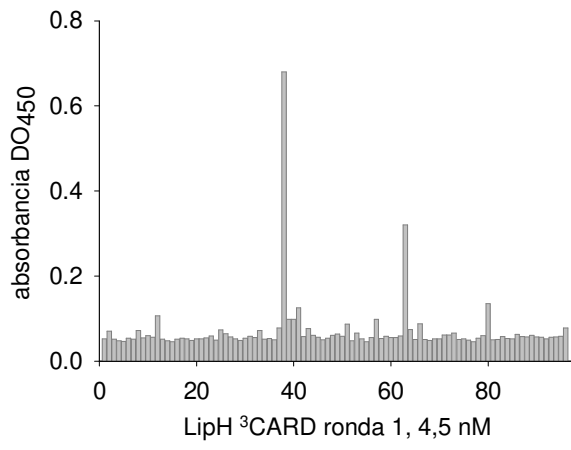
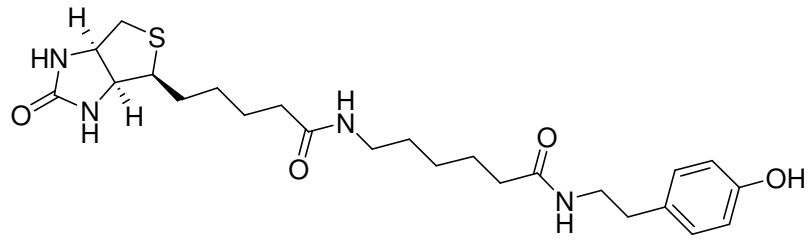


Figura 12

A



B

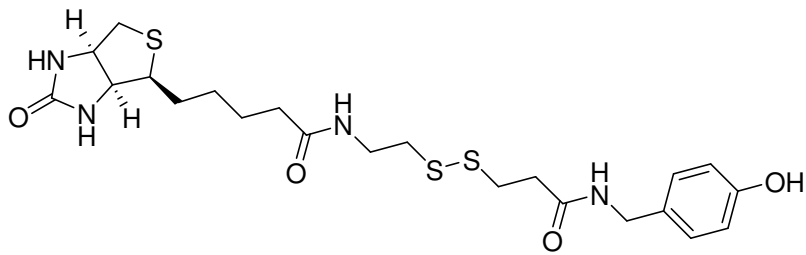


Figura 13

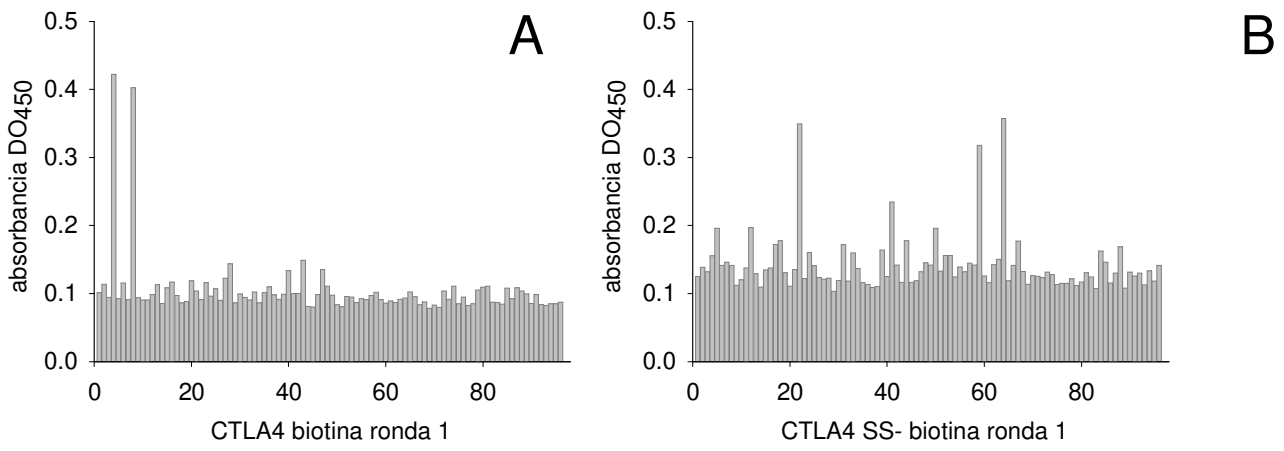


Figura 14

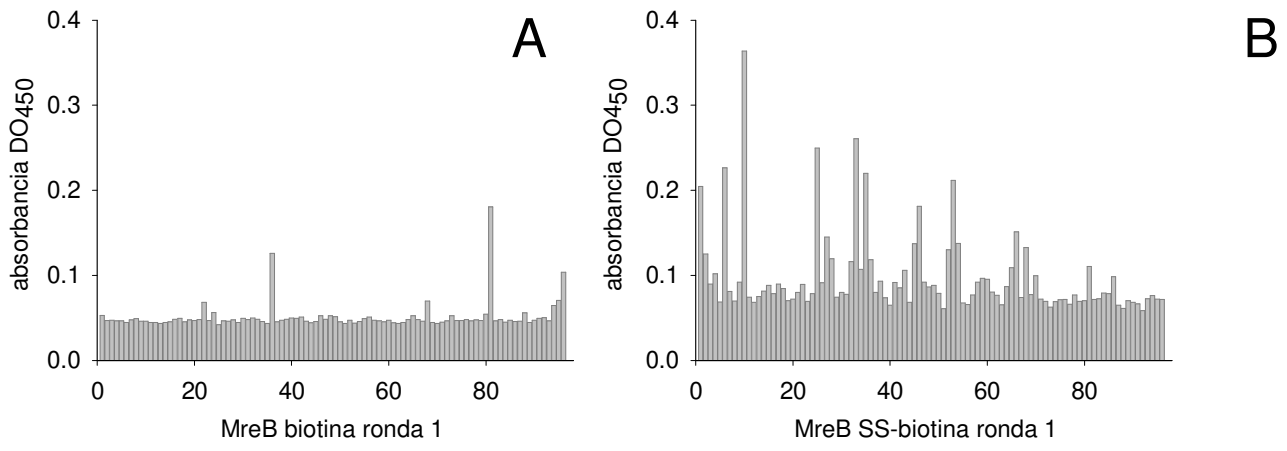


Figura 15

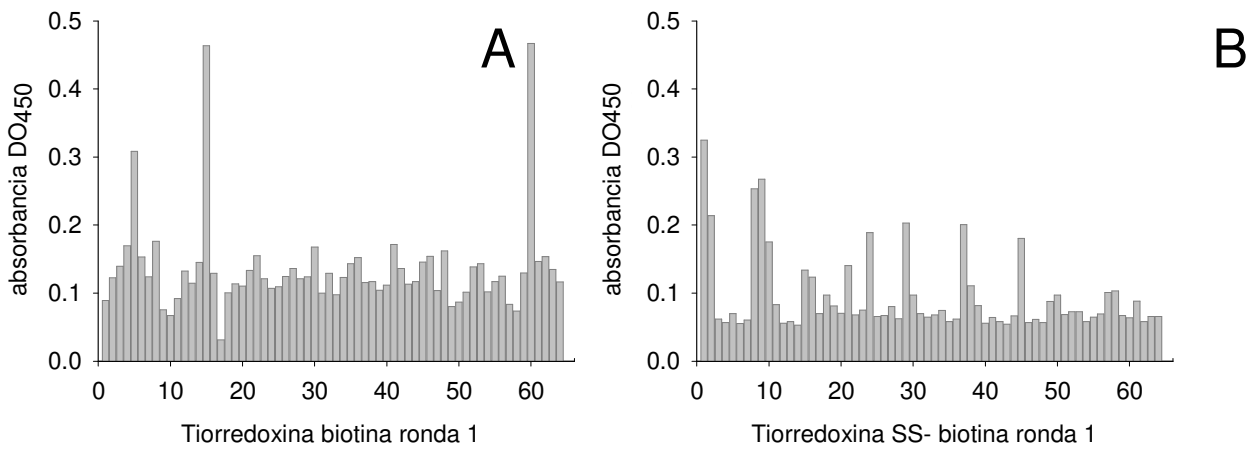


Figura 16