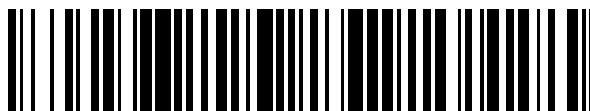


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 068**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2014 PCT/US2014/043454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14209801**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2014 E 14816936 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3014271**

54 Título: **Descubrimiento de antígenos objetivo, cribados fenotípicos y uso de los mismos para la identificación de epítomos objetivo específicos de células objetivo**

30 Prioridad:

28.06.2013 US 201361840583 P

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

30.10.2020

73 Titular/es:

**X-BODY, INC. (100.0%)
100 Beaver Street, Suite 101
Waltham, MA 02453, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, YAN y
SHAMAH, STEVE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 791 068 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

Descubrimiento de antígenos objetivo, cribados fenotípicos y uso de los mismos para la identificación de epítomos objetivo específicos de células objetivo

5

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de Estados Unidos relacionada n.º 61/840.583, presentada el 28 de junio de 2013, titulada "Descubrimiento de antígenos objetivo y cribados fenotípicos".

10

Antecedentes

Los polipéptidos de unión, tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos, son comercialmente importantes como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Los métodos tradicionales de detección de polipéptidos de unión generalmente emplean antígenos solubles. Sin embargo, para ciertos antígenos de la superficie celular, los epítomos conformacionales en estos antígenos se alteran cuando los antígenos se solubilizan de la membrana plasmática, lo que da como resultado fallos a la hora de generar polipéptidos de unión que puedan reconocer el antígeno nativo. En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de nuevos métodos de detección de polipéptidos de unión que puedan unirse específicamente a los antígenos de la superficie celular en su conformación nativa.

15

20

Sumario

La invención proporciona métodos y composiciones para identificar polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se unen específicamente a un antígeno de superficie celular. Los métodos de la invención generalmente comprenden poner en contacto una biblioteca de polipéptidos de unión de ácido nucleico libre de células variegado con un antígeno de la superficie celular exhibido en la superficie exterior de una célula; y aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al antígeno de la superficie celular en la superficie exterior de la célula. Los métodos y composiciones de la invención son particularmente ventajosos porque permiten la identificación rápida de polipéptidos de unión que se unen a formas nativas del antígeno de superficie celular diana. Estos métodos y composiciones también permiten la identificación de nuevos antígenos o epítomos específicos de tipo celular terapéuticamente útiles.

25

30

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de ejemplos de composiciones de expresión de ADN y métodos de cribado de la invención.

35

La figura 2 es un esquema de ejemplos de composiciones de expresión de ADN y métodos de cribado de la invención.

La figura 3 es un esquema de estrategias de ejemplo de cribado de células diana empleadas en los métodos de la invención.

40

La figura 4 es un esquema de estrategias paralelas de ejemplo de cribado y secuenciación profunda empleadas en los métodos de la invención.

45

La figura 5 es un esquema de estrategias paralelas de ejemplo de cribado y secuenciación profunda empleadas en los métodos de la invención.

La figura 6 es un esquema de estrategias paralelas de ejemplo de cribado y secuenciación profunda empleadas en los métodos de la invención.

50

La figura 7 es un esquema de los resultados de las estrategias paralelas de ejemplo de cribado empleadas en los métodos de la invención.

La figura 8 representa un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión basado en FACS de moléculas de VH de alta afinidad seleccionadas usando los métodos de la invención.

55

La figura 9 representa gráficos que muestran la unión diferencial de moléculas de VH seleccionadas usando los métodos de la invención.

La figura 10 representa gráficos que muestran la unión diferencial de las moléculas de VH seleccionadas usando los métodos de la invención.

60

65

Descripción detallada

La invención proporciona un método para identificar un polipéptido de unión que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular, en el que el polipéptido de unión comprende un dominio VH o VL de anticuerpo, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una biblioteca de expresión de ácido nucleico libre de células acumulado de polipéptidos de unión con un antígeno de la superficie celular exhibido en la superficie exterior de un primer tipo celular, en el que la biblioteca de expresión de ácido nucleico variegado es una biblioteca de expresión de ADN, en donde cada miembro de la biblioteca de expresión de ADN comprende un polipéptido de unión unido a través de un enlazador de ADN intermedio a una secuencia de codificación de ADN que codifica el polipéptido de unión, y en el que el enlazador de ADN comprende un sitio de endonucleasa de restricción no presente en la secuencia de codificación de miembros de la biblioteca de expresión de ADN;

(b) separar los miembros de la biblioteca unidos del primer tipo de célula escindiendo el sitio de la endonucleasa de restricción con una endonucleasa de restricción adecuada; y

(c) aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al antígeno de la superficie celular en la superficie exterior del primer tipo celular, identificando así un polipéptido de unión que se une específicamente al antígeno de la superficie celular.

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "biblioteca de expresión de ácido nucleico" se refiere a cualquier expresión unida a fenotipo-genotipo libre de células in vitro reconocida en la técnica, incluyendo, sin limitaciones, las establecidas en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 7,195,880; 6,951,725; 7,078,197; 7,022,479; 6,518,018; 7,125,669; 6,846,655; 6,281,344; 6,207,446; 6,214,553; 6,258,558; 6,261,804; 6,429,300; 6,489,116; 6,436,665; 6,537,749; 6,602,685; 6,623,926; 6,416,950; 6,660,473; 6,312,927; 5,922,545; y 6,348,315, y en el documento WO2010/011944.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a la molécula reconocida por un polipéptido de unión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de una molécula de unión (por ejemplo, un dominio VH o VL) para unirse a un antígeno con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o más, y/o se unen a un objetivo con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno inespecífico.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviado VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL abreviada) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR).

Como se usa en el presente documento, la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluye cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y opcionalmente constantes del anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de porciones de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada). Otras moléculas modificadas, como los diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, también están incluidos dentro de la expresión "porción de unión a antígeno".

Como se usa en el presente documento, los términos "dominio VH" y "dominio VL" se refieren a dominios pesados y ligeros variables de un solo anticuerpo, respectivamente, que comprenden FR (regiones marco) 1, 2, 3 y 4 y CDR (regiones determinantes de la complementariedad) 1, 2 y 3 (véase Kabat y col. (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico. (Publicación NIH No. 91-3242, Bethesda).

II Antígenos de superficie celular

Cualquier antígeno que sea capaz de mostrarse en la superficie de una célula puede emplearse en los métodos de la invención, incluyendo, sin limitación, proteínas, glicanos y/o antígenos lipídicos. En ciertas realizaciones, el antígeno es una molécula natural. Los ejemplos adecuados y no limitantes de antígenos naturales incluyen proteínas transmembrana (por ejemplo, receptores acoplados a proteínas G) y proteínas ancladas a GPI. En ciertas realizaciones, el antígeno es un antígeno recombinante o sintético de origen no natural. Los ejemplos adecuados y no limitantes de antígenos naturales incluyen antígenos quiméricos que comprenden porciones de diferentes moléculas de antígeno. En ciertas realizaciones, la identidad del antígeno se conoce antes de preformar los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, la identidad del antígeno es desconocida antes de preformar los métodos de la invención.

Los antígenos de la superficie celular empleados en los métodos de la invención pueden mostrarse en cualquier célula o partícula similar a una célula (por ejemplo, vesícula lipídica). En ciertas realizaciones, la célula es un tipo de célula que expresa naturalmente el antígeno de la superficie celular. En ciertas realizaciones, la célula es una célula recombinante que está diseñada por ingeniería para expresar heterológicamente el antígeno de la superficie celular. En ciertas realizaciones, la célula es una variante asociada a la enfermedad de una célula normal (por ejemplo, una célula tumoral).

III. Polipéptidos de unión

Se puede emplear cualquier tipo de polipéptido de unión en los métodos de la invención que incluyen, sin limitación, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, y dominios de tipo inmunoglobulina. Los dominios de tipo inmunoglobulina adecuados incluyen, sin limitación, dominios de fibronectina (véase, por ejemplo Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol.* 352: 95-109), DARPIn (véase, por ejemplo, Stumpp et al. (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15-16): 695-701), dominios Z de la proteína A (véase, Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2668-76), lipocalinas (véase, por ejemplo, Skerra et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2677-83), afilinas (véase, por ejemplo, Ebersbach y col. (2007) *J. Mol. Biol.* 372 (1): 172-85), afilinas (véase, por ejemplo, Krehenbrink et al. (2008). *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-68), avímeros (véase, por ejemplo, Silverman et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12): 1556-61), finómeros (véase, por ejemplo, Grabulovski et al. (2007) *J Biol Chem* 282 (5): 3196-3204) y péptidos de dominio Kunitz (véase, por ejemplo Nixon et al. (2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2): 261-8). En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión es el dominio VH o VL del anticuerpo.

IV. Métodos de expresión de superficie celular

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método para identificar un polipéptido de unión que se une específicamente a un antígeno de superficie celular, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una biblioteca de polipéptidos de unión de expresión de ácido nucleico con un antígeno de superficie celular mostrado en la superficie exterior de un primer tipo de célula; y (b) aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al antígeno de la superficie celular en la superficie exterior del primer tipo celular, identificando así un polipéptido de unión que se une específicamente al antígeno de la superficie celular.

Como se ha señalado anteriormente, la invención proporciona un método para identificar un polipéptido de unión que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular, en el que el polipéptido de unión comprende un dominio VH o VL de anticuerpo, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una biblioteca de expresión de ácido nucleico libre de células variegado de polipéptidos de unión con un antígeno de la superficie celular expresado en la superficie exterior de un primer tipo celular, en el que la biblioteca de expresión de ácido nucleico variegado es una biblioteca de expresión de ADN, en el que cada miembro de la biblioteca de expresión de ADN comprende un polipéptido de unión unido a través de un enlazador de ADN intermedio a una secuencia de codificación de ADN que codifica el polipéptido de unión, y en el que el enlazador de ADN comprende un sitio de endonucleasa de restricción no presente en la secuencia de codificación de miembros del ADN mostrar biblioteca;

(b) separar los miembros de la biblioteca unidos del primer tipo de célula escindiendo el sitio de endonucleasa de restricción con una endonucleasa de restricción adecuada; y

(c) aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al antígeno de la superficie celular en la superficie exterior del primer tipo celular, identificando así un polipéptido de unión que se une específicamente al antígeno de la superficie celular.

En ciertas realizaciones de la invención, antes de la etapa (a) la biblioteca de polipéptidos de unión de ácidos nucleicos variegados se pone en contacto con un segundo tipo de célula que no muestra el antígeno mostrado en la superficie exterior, para limpiar previamente el biblioteca de polipéptidos de unión que no se unen específicamente al antígeno.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método para identificar un polipéptido de unión que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una biblioteca

de polipéptidos de unión de ácido nucleico variegado con un primer tipo de célula que expresa un antígeno de superficie celular y aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al primer tipo de célula; (b) poner en contacto la biblioteca de expresión de ácido nucleico variegado de polipéptidos de unión con un segundo tipo celular que no expresa el antígeno de la superficie celular y aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al segundo tipo celular; y (c) seleccionar miembros de la biblioteca que se unan específicamente al primer tipo de célula pero no al segundo tipo de célula, identificando así un polipéptido de unión que se une específicamente al antígeno de la superficie celular.

El método para identificar un polipéptido de unión que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular, en el que el polipéptido de unión comprende un dominio VH o VL de anticuerpo según lo dispuesto por la invención puede comprender además:

(d) poner en contacto la biblioteca de polipéptidos de unión de expresión de ácido nucleico variegado con un segundo tipo celular que no expresa el antígeno de la superficie celular;

(e) aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al segundo tipo de célula, y opcionalmente separar el al menos un miembro de la biblioteca aislado que se une específicamente al segundo tipo de célula del segundo tipo de célula; y

(f) seleccionar miembros de la biblioteca que se unan específicamente al primer tipo de célula pero no al segundo tipo de célula.

Las bibliotecas de expresión de ácido nucleico adecuadas para su uso en los métodos de la invención se exponen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 7,195,880; 6,951,725; 7,078,197; 7,022,479; 6,518,018; 7,125,669; 6,846,655; 6,281,344; 6,207,446; 6,214,553; 6,258,558; 6,261,804; 6,429,300; 6,489,116; 6,436,665; 6,537,749; 6,602,685; 6,623,926; 6,416,950; 6,660,473; 6,312,927; 5,922,545; y 6,348,315, y en el documento WO2010/011944. En ciertas realizaciones, la biblioteca de expresión de ácido nucleico variegado es una biblioteca de expresión de ADN. En una realización, la biblioteca de expresión de ácido nucleico es una biblioteca de expresión de ADN descrita en el presente documento o en el documento WO2010/011944.

En ciertas realizaciones, cada miembro de la biblioteca de expresión de ADN comprende un polipéptido de unión unido a través de un enlazador de ADN intermedio a una secuencia de codificación de ADN que codifica el polipéptido de unión, en el que el enlazador de ADN comprende un sitio de endonucleasa de restricción (véase, por ejemplo, la Figura 1). Se puede emplear cualquier sitio de endonucleasa de restricción. En una realización particular, el sitio de endonucleasa de restricción no está presente en la secuencia de codificación de ADN de los miembros de la biblioteca de expresión de ADN, evitando así la escisión de la secuencia de codificación de ADN tras la digestión de la endonucleasa de restricción de los miembros de la biblioteca. En una realización particular, el sitio de endonucleasa de restricción es un sitio Not1.

En ciertas realizaciones, es deseable separar físicamente la secuencia de codificación de ADN de los miembros de la biblioteca aislada del polipéptido de unión unido. Se puede emplear cualquier método de separación física. Cuando los miembros de la biblioteca aislada comprenden un enlazador de ADN que comprende un sitio de endonucleasa de restricción (véase, por ejemplo, la Figura 1), la separación física se puede lograr mediante la digestión con endonucleasa de restricción de los miembros de la biblioteca aislada. Las secuencias codificantes de ADN liberadas resultantes pueden separarse adicionalmente de los complejos de polipéptido de unión/célula mediante cualquier método reconocido en la técnica, por ejemplo, centrifugación.

En ciertas realizaciones, es deseable separar físicamente los miembros de biblioteca aislados del primer y/o segundo tipo de célula. Se puede emplear cualquier método de separación física. En ciertas realizaciones, los miembros de la biblioteca aislados se separan del primer o segundo tipo de célula mediante escisión enzimática del antígeno de la superficie celular. Se puede emplear cualquier método de escisión enzimática del antígeno, por ejemplo, escisión enzimática de proteasa, lípidos y/o glucosidasa. En ciertas realizaciones, donde el antígeno de la superficie celular está unido a la superficie celular por un ancla de glicolípido, los miembros de la biblioteca aislados se separan del primer o segundo tipo de célula por escisión de fosfolipasa del ancla de glicolípido. Los miembros de biblioteca aislados liberados resultantes pueden separarse adicionalmente del primer o segundo tipo de célula mediante cualquier método reconocido en la técnica, por ejemplo, centrifugación.

Una vez que se han aislado los miembros de la biblioteca que se unen específicamente al primer y/o segundo tipo de célula, se puede determinar la secuencia de codificación de ADN de estas moléculas. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además la etapa de determinar la secuencia de codificación de ADN de al menos una porción de los miembros de biblioteca aislados. Se puede emplear cualquier medio reconocido en la técnica para la determinación de la secuencia de ADN. En una realización particular, la secuencia de codificación de ADN se determina mediante técnicas de secuenciación profunda de molécula única (por ejemplo, secuenciación de pirocopia). Las técnicas de secuenciación profunda de molécula única son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las descritas en el documento US6,210,891) En ciertas realizaciones, donde los polipéptidos de unión son anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se determina la secuencia de codificación de

ADN de la región CDR3. En ciertas realizaciones, se determinan las secuencias de codificación de ADN del miembro de la biblioteca que se unen al primer y segundo tipo de células. Se considera que los miembros de la biblioteca que se unen específicamente al primer tipo de célula pero no al segundo tipo de célula comprenden polipéptidos de unión que se unen específicamente a un antígeno específico para el primer tipo de célula.

5 Una vez que se ha identificado un polipéptido de unión que se une específicamente al antígeno de la superficie celular, se puede expresar de forma heteróloga *in vitro* (por ejemplo, en células o en un sistema de expresión libre de células) o *in vivo* (por ejemplo, en un animal transgénico). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además la etapa de expresar heterológicamente *in vitro* (por ejemplo, en células o en un sistema de expresión libre de células) o *in vivo* (por ejemplo, en un animal transgénico), el polipéptido de unión identificado.

10 En ciertas realizaciones, la identidad del antígeno se conoce antes de realizar los métodos de la invención. Sin embargo, no es necesario conocer la identidad del antígeno. De hecho, en ciertas realizaciones, la identidad del antígeno es desconocida antes de realizar los métodos de la invención. Por lo tanto, en este último caso, los métodos de la invención permiten la identificación de nuevos antígenos y epítopos presentes en la superficie de un tipo de célula de interés (por ejemplo, una célula tumoral).

15 En ciertas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento comprenden la selección de polipéptidos de unión que son capaces de internalización funcional tras la unión al antígeno de la superficie celular. Dichos polipéptidos de unión son particularmente útiles en la producción de conjugados de fármacos porque permiten el suministro de un fármaco citotóxico al interior de una célula diana. Se puede emplear cualquier metodología para la detección de la internalización funcional. Por ejemplo, la biblioteca de polipéptidos de unión de ácido nucleico variada puede ponerse en contacto con las células diana en condiciones que permitan la internalización del polipéptido de unión (por ejemplo, durante aproximadamente 1-2 horas a 37 °C). Las células pueden lavarse y lisarse con tampón de lisis celular en presencia de inhibidores de la proteasa. Los miembros de la biblioteca internalizados pueden precipitarse con etanol y las secuencias de codificación de ADN enriquecerse por amplificación por PCR.

20 Los métodos desvelados en el presente documento pueden aplicarse a cualquier proceso de descubrimiento de epítopos objetivo. Por ejemplo, los epítopos objetivo pueden incluir: dominios de referencia para inflamación; epítopos diana específicos de tumor de tumores primarios con o sin resistencia al tratamiento, líneas celulares tumorales y tumores que albergan cualquier mutación que pueda producir neoepítopos; y otros epítopos específicos de la enfermedad que median el mal funcionamiento específico de la enfermedad y son el objetivo de la terapia biológica

25 Los métodos desvelados en el presente documento también se pueden aplicar para el descubrimiento de biomarcadores para controlar la presencia o ausencia de epítopos particulares de la superficie celular en el transcurso de un tratamiento farmacológico para pacientes. Los anticuerpos derivados del descubrimiento de biomarcadores también pueden usarse como herramientas para la detección de biomarcadores.

30 Adicionalmente o como alternativa, los métodos desvelados en el presente documento pueden aplicarse al descubrimiento de objetivos o epítopos en otras especies, como en animales transgénicos y modelos de enfermedades animales.

V. Ejemplos

A. Sumario

35 Se construyó una biblioteca de VH de anticuerpos completamente humanos obtenidos de médula ósea, sangre periférica y esplenocitos de donantes humanos y se identificaron numerosos aglutinantes de VH de alta afinidad y específicos para múltiples objetivos utilizando la tecnología de expresión de ADNds. Los epítopos específicos de la célula objetivo se identificaron mediante selección de células vivas y análisis de secuenciación profunda utilizando la biblioteca de VH humana y la tecnología de expresión de ADNds. Se aplicaron estrategias de selecciones paralelas, diferenciales y selecciones selectivas de células diana en estos métodos (véanse las Figuras 4, 5, 6). La tabulación de la frecuencia CDR3 de la secuenciación profunda de todos los grupos en todas las rondas predijo la selectividad de los clones VH. Se identificaron VH de alta afinidad que se unen selectivamente a las células objetivo y los tipos de células relacionadas.

B. Ingeniería de bibliotecas y métodos de selección para el descubrimiento de epítopos de células vivas

40 Se desarrollaron dos métodos para recuperar de forma eficaz los miembros de la biblioteca que se unen a las células vivas.

45 El primer método consistió en eliminar los aglutinantes de las células vivas mediante la digestión de restricción del ADN fusionado a los anticuerpos unidos. Este método permite la recuperación completa de los VH unidos a todos los epítopos en las células. Se diseñó una biblioteca de ADN C-terminal de VH para transportar un sitio de restricción NotI (ver Figura 1). No hay sitios NotI en estructuras de VH ingenuas y, por lo tanto, solo los aglutinantes de VH de longitud completa se eluyen de las células para su posterior amplificación. El tampón de digestión de restricción NotI se probó

en células vivas, y con una incubación de hasta 2 horas a 37°C, las células eran viables. La eficiencia de la digestión de NotI fue alta. Después de la unión de la biblioteca a las células durante 1 hora a 4 ° C, las células se lavaron y se digirieron con tampón NotI a 37 ° C durante 1 hora, las células se centrifugaron, se recogió el sobrenadante (que contenía el ADN de VH unido) para la amplificación por PCR (véase Figura 1).

El segundo método es cortar los aglutinantes de VH de las células vivas utilizando la digestión con fosfolipasa C (PLC). Este método permite la elución de los VH que se unen a los epítomos de cualquier proteína de membrana anclada a GPI (es decir, un subconjunto de epítomos). La eficacia de recorte del PLC es alta, como se valida en FACS con molécula de control. Después de la incubación de la biblioteca con células durante 1 hora a 4 ° C, las células se lavaron y se incubaron con PLC a 37 ° C durante 15 minutos. Las células se centrifugaron posteriormente y el sobrenadante, que contiene VH de fusión en complejo con el dominio extracelular de células de la proteína de membrana anclada a GPI, se amplificó por PCR (véase la Figura 2).

C. Selecciones paralelas, selecciones diferenciales y selecciones selectivas de células objetivo en tipos de células objetivo y relacionadas/no deseadas

La biblioteca de fusión intacta maestra se produjo de acuerdo con el protocolo establecido en el documento WO2010/011944. Para la primera ronda de selección, la biblioteca de fusión purificada se dividió por igual en varias bibliotecas que tienen la misma diversidad para todas las ramas de selección (véase la figura 5).

Las células primarias, obtenidas de donantes o pacientes normales, se descongelaron frescas o se aislaron de matraces de cultivo celular, siguiendo protocolos estándar de biología celular. Luego, las células se recuperaron durante 1 hora en medio completo a 37 ° C seguido de bloqueo en el tampón de selección durante 30 minutos en hielo. Todas las selecciones se llevaron a cabo en hielo para evitar la internalización de anticuerpos y objetivos.

Para las selecciones paralelas, las bibliotecas se aclararon previamente con 200 ul de perlas de estreptavidina prebloqueadas y 200 ul de perlas de epoxi hlgG prebloqueadas durante 30 minutos a temperatura ambiente de forma secuencial para eliminar cualquier miembro de la biblioteca mal plegado y pegajoso. Las bibliotecas previamente eliminadas se enfriaron en hielo y se sometieron a células previamente bloqueadas y se incubaron en hielo durante 1 hora.

Para las selecciones selectivas de células objetivo, se realizó un aclaramiento previo en tipos de células no deseadas y estrechamente relacionadas durante 1 hora en hielo para eliminar cualquier aglutinante no selectivo y luego se sometió a células objetivo.

En la ronda de selección 4, se aplicaron métodos de selección diferencial a las ramas de selección en las células objetivo (con y sin eliminación previa en las células). En esta ronda, las bibliotecas se dividieron en múltiples tubos y se unieron a cada tipo de célula y las células del paciente desde diferentes etapas de las enfermedades en paralelo. Esta estrategia permitió la comparación directa de las células objetivo frente a otros tipos de células mediante análisis de secuenciación profunda e identificación de aglutinantes que reconocen diferentes epítomos que surgieron con la progresión de la enfermedad (véase la Figura 6).

Para todas las ramas de selección, después de la unión, las células se lavaron con 10 ml de tampón de unión y se sometieron a digestión de restricción NotI para recuperar todos los aglutinantes a la proteína de membrana o al recorte PLC para recuperar los aglutinantes a las proteínas de membrana ancladas a GPI como se describió anteriormente.

D. Análisis de secuenciación profunda para predecir aglutinantes selectivos a las células objetivo

Después de cada ronda de selección, los grupos de unión se amplificaron por PCR. La HCDR3 de cada grupo de unión se levantó por PCR con oligos cebando el C-terminal del marco 3 y el N-terminal del marco 4 de fragmentos VH. Estos fragmentos de HCDR3 derivados de rondas y ramas de selección individual se etiquetaron con un código de barras de ADN específico utilizado para la secuenciación de Illumina por PCR. Los HCDR3 etiquetados se agruparon y se enviaron para una secuenciación de alto rendimiento con tecnología Hi Seq. Los grupos de unión de la ronda 4 de las células objetivo también se marcaron con un código de barras de ADN y se enviaron para la secuenciación 454 para obtener secuencias VH completas.

Las secuencias se desconvolucionaron en base al código de barras de ADN después de la secuenciación. Se tabularon millones de secuencias derivadas de cada ronda de selección y rama de selección comparando la frecuencia de una secuencia CDR3 particular presente en diferentes rondas y ramas de selección. Los criterios utilizados para la identificación de aglutinantes selectivos fueron: 1) enriquecimiento específico de una secuencia CDR3 de una ronda anterior a otra en las células objetivo, no en los tipos de células relacionadas o de control; 2) mayor frecuencia en el tipo de célula específica del objetivo y bajo en el control o tipo de célula estrechamente relacionada en la ronda de selección diferencial (ver Figura 7); y 3) secuencias no presentes en otras selecciones objetivo o celular de otros programas en la base de datos. Los clones selectivos identificados por la secuenciación Illumina se sintetizaron luego en base a la información de la secuencia completa de 454.

E. Ensayos de producción, purificación y unión por FACS

Los grupos de unión y las VH sintetizadas se subclonaron luego en vectores de expresión pET22b. Los VH se produjeron en células BL-21 E. coli y se purificaron a través de la etiqueta His C-terminal utilizando protocolos estándar. El ensayo FACS se realizó para evaluar la unión y selectividad de VH a diferentes tipos de células y la CE50 de los aglutinantes. Se identificaron aglutinantes de VH de alta afinidad y selectivos a través del proceso de selección de células vivas (véanse las Figuras 8, 9 y 10).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar un polipéptido de unión que se une específicamente a un antígeno de superficie celular, en el que el polipéptido de unión comprende un dominio VH o VL de anticuerpo, comprendiendo el método:
- 10 (a) poner en contacto una biblioteca de expresión de ácido nucleico libre de células variegado de polipéptidos de unión con un antígeno de la superficie celular exhibido en la superficie exterior de un primer tipo celular, en el que la biblioteca de expresión de ácido nucleico variegado es una biblioteca de expresión de ADN, en el que cada miembro de la biblioteca de expresión de ADN comprende un polipéptido de unión unido a través de un enlazador de ADN intermedio a una secuencia de codificación de ADN que codifica el polipéptido de unión, y en el que el enlazador de ADN comprende un sitio de endonucleasa de restricción no presente en la secuencia de codificación de miembros del ADN mostrar biblioteca;
- 15 (b) separar los miembros de la biblioteca unidos del primer tipo de célula escindiendo el sitio de endonucleasa de restricción con una endonucleasa de restricción adecuada; y
- 20 (c) aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al antígeno de la superficie celular en la superficie exterior del primer tipo celular, identificando así un polipéptido de unión que se une específicamente al antígeno de la superficie celular.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que antes de la etapa (a), la biblioteca de polipéptidos de unión de ácidos nucleicos variegados se pone en contacto con un segundo tipo celular que no muestra el antígeno de la superficie celular en su superficie exterior.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- (d) poner en contacto la biblioteca de polipéptidos de unión a ácidos nucleicos variegados con un segundo tipo celular que no expresa el antígeno de la superficie celular;
- 35 (e) aislar de la biblioteca al menos un miembro de la biblioteca que se une específicamente al segundo tipo de célula, y opcionalmente separar el al menos un miembro de la biblioteca aislado que se une específicamente al segundo tipo de célula del segundo tipo de célula; y
- (f) seleccionar miembros de la biblioteca que se unan específicamente al primer tipo de célula pero no al segundo tipo de célula.
- 40 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además determinar la secuencia de codificación de ADN de al menos una porción de los miembros de la biblioteca aislados, opcionalmente en el que la secuencia de codificación de ADN se determina por pirosecuenciación.
- 45 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno es una proteína, glicano o lípido natural, o el antígeno es una proteína anclada al glucofosfatidilinositol (GPI), o el antígeno es un antígeno recombinante, o el antígeno es un antígeno quimérico.
- 50 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer tipo de célula es una célula que expresa naturalmente el antígeno de la superficie celular, o el primer tipo de célula es una célula recombinante que está diseñada para expresar heterológicamente el antígeno de la superficie celular, o el primer tipo de célula es una variante asociada a la enfermedad de una célula normal, o el primer tipo de célula es una célula tumoral.
- 55 7. El método de la reivindicación 1, en el que el primer tipo de célula es una célula viva.
8. El método de la reivindicación 2, en el que el primer y el segundo tipo de células son células vivas.
9. El método de la reivindicación 3, en el que el primer y el segundo tipo de células son células vivas.
- 60 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido de unión es un anticuerpo o fragmento del mismo.

60

65

Extracción de V_H de células mediante digestión por restricción

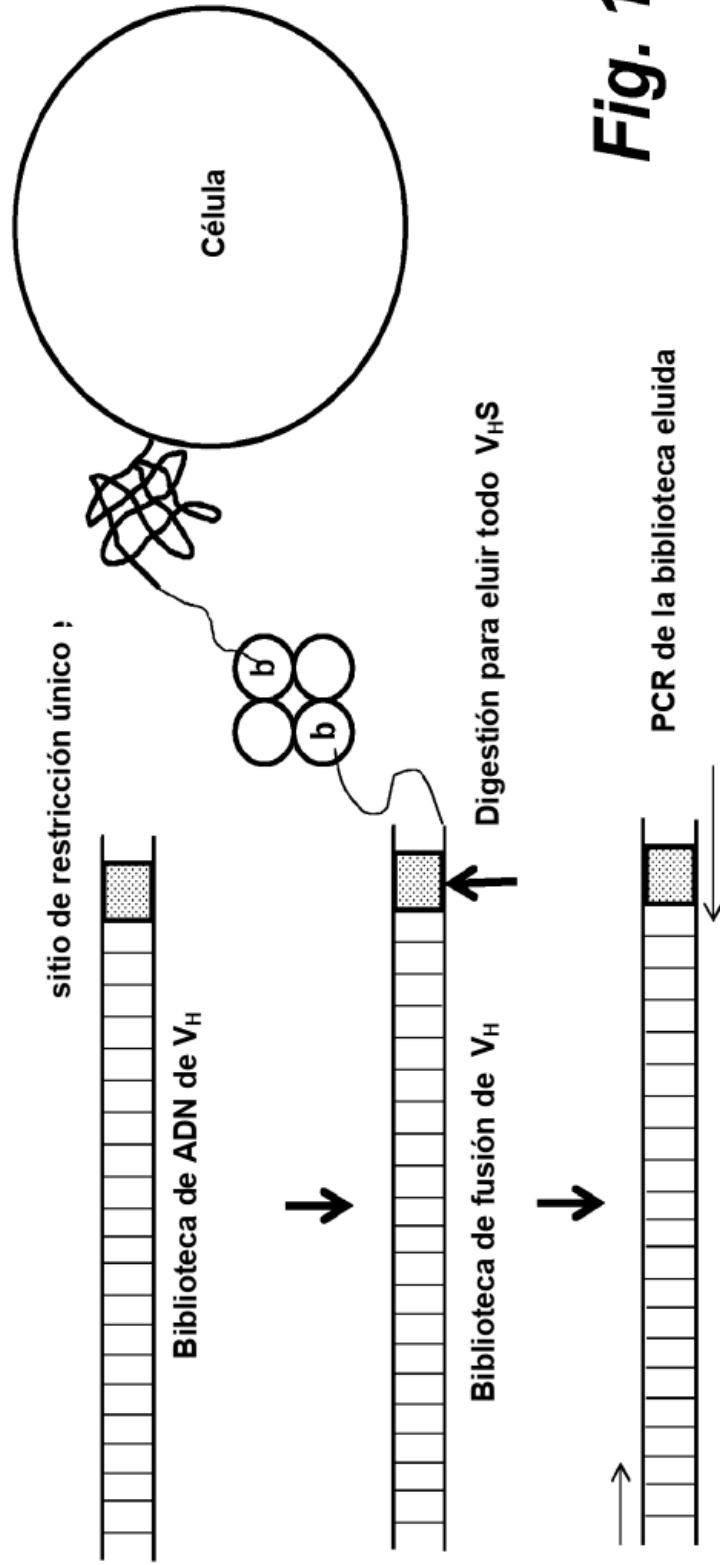
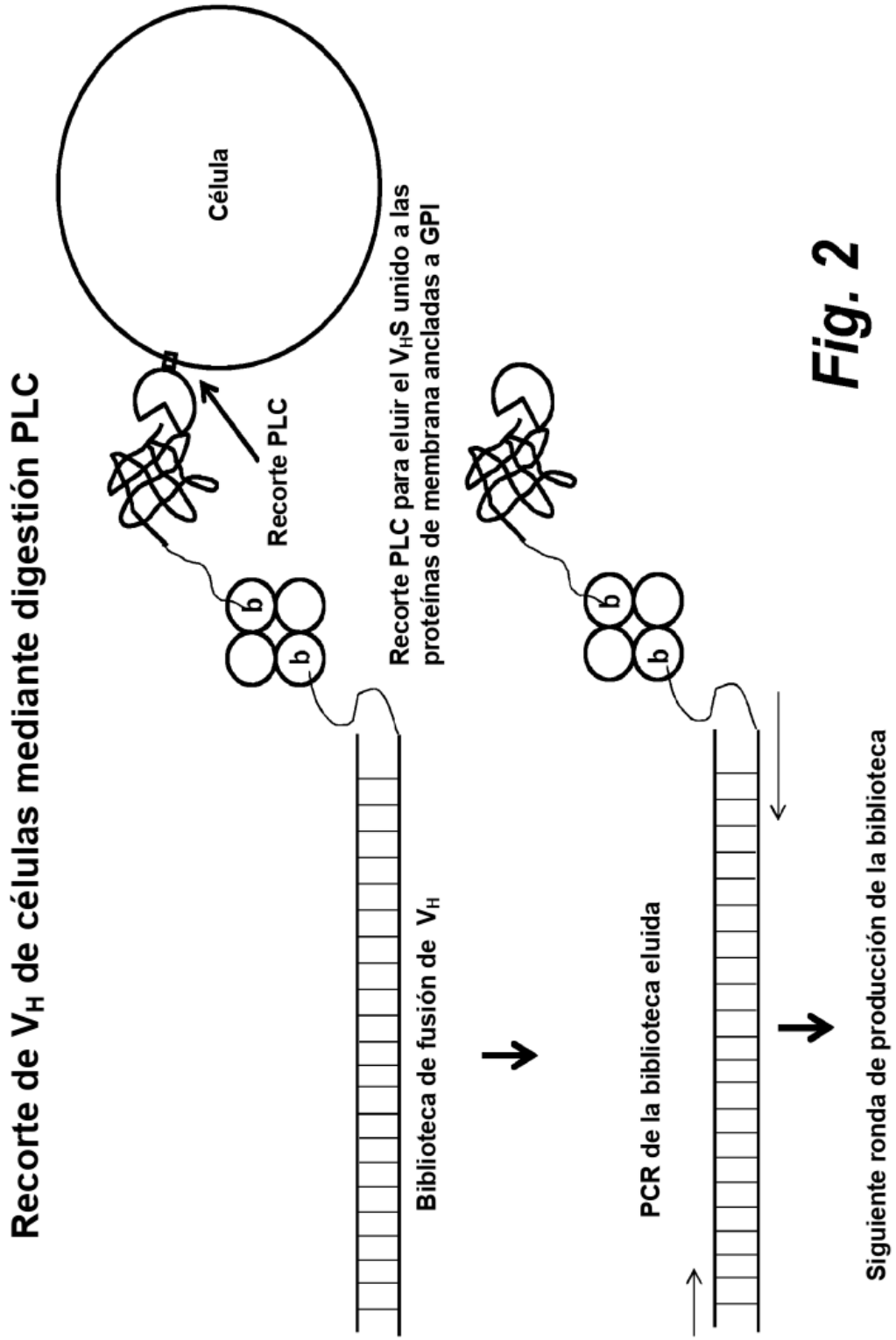


Fig. 1

Siguiente ronda de producción de la biblioteca



Identificación de aglutinantes a la célula objetivo "A" que no se unen a las células control B, C o D

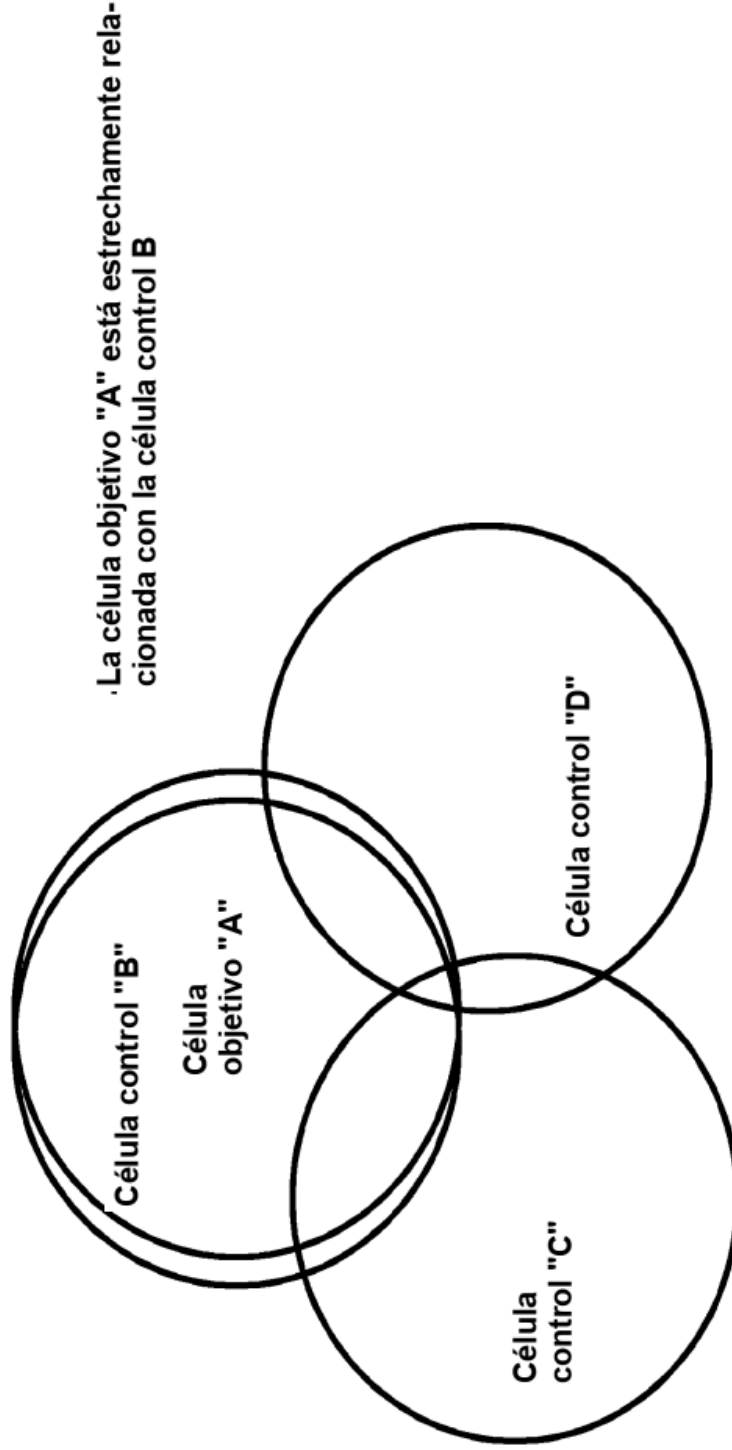


Fig. 3

Selección de células vivas y secuenciación profunda para identificar epítomos objetivos específicos de la célula objetivo

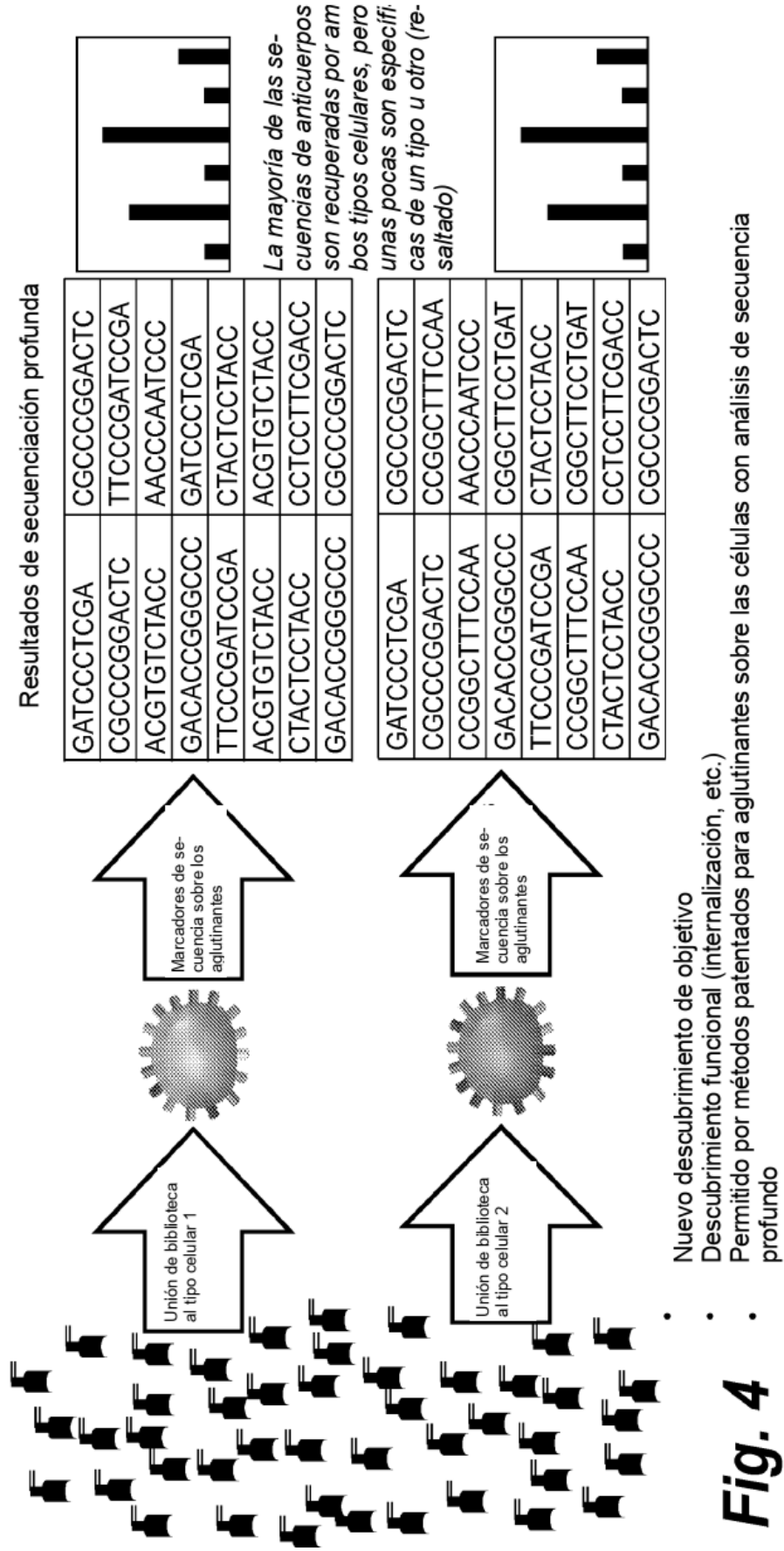


Fig. 4

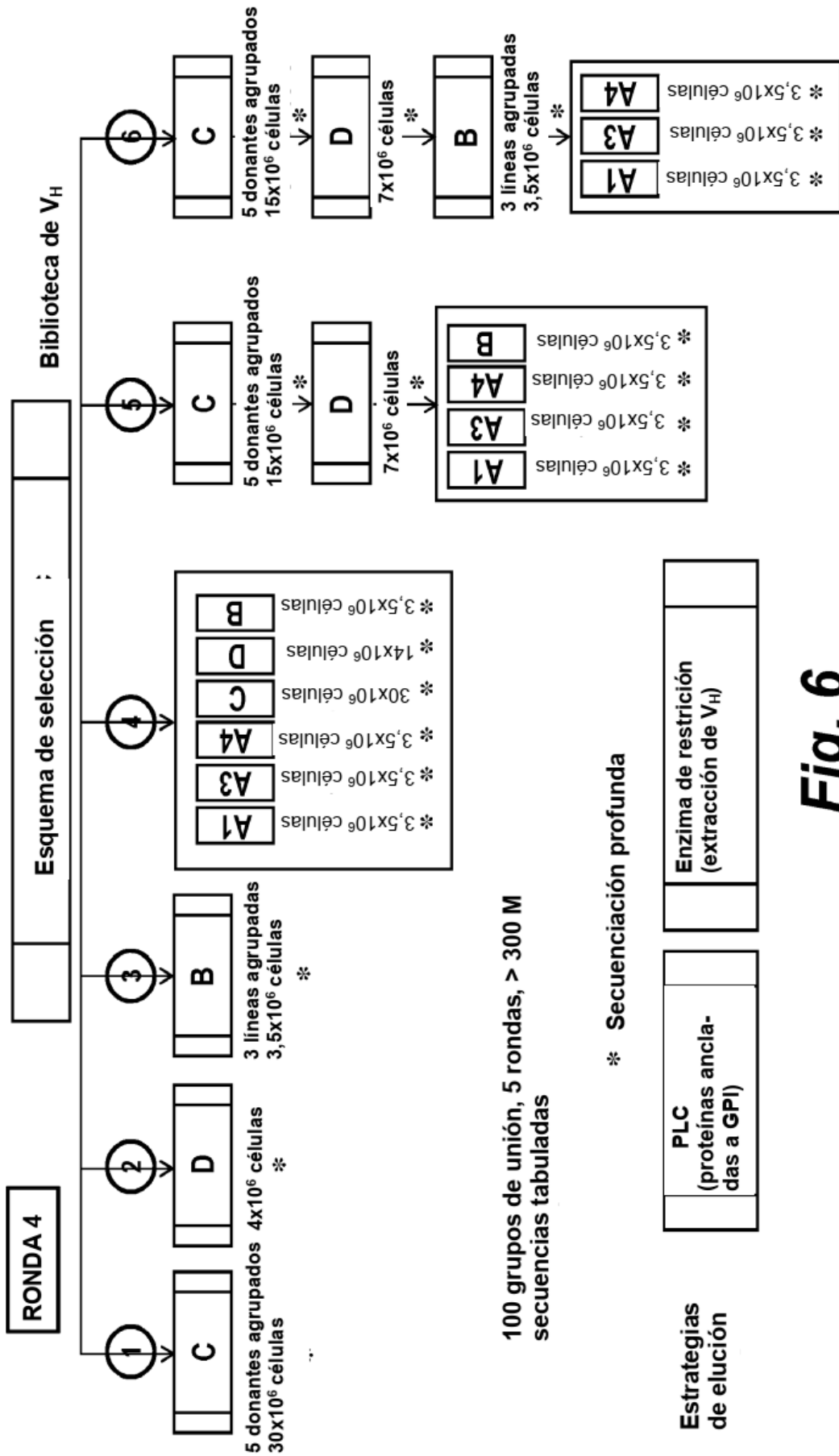
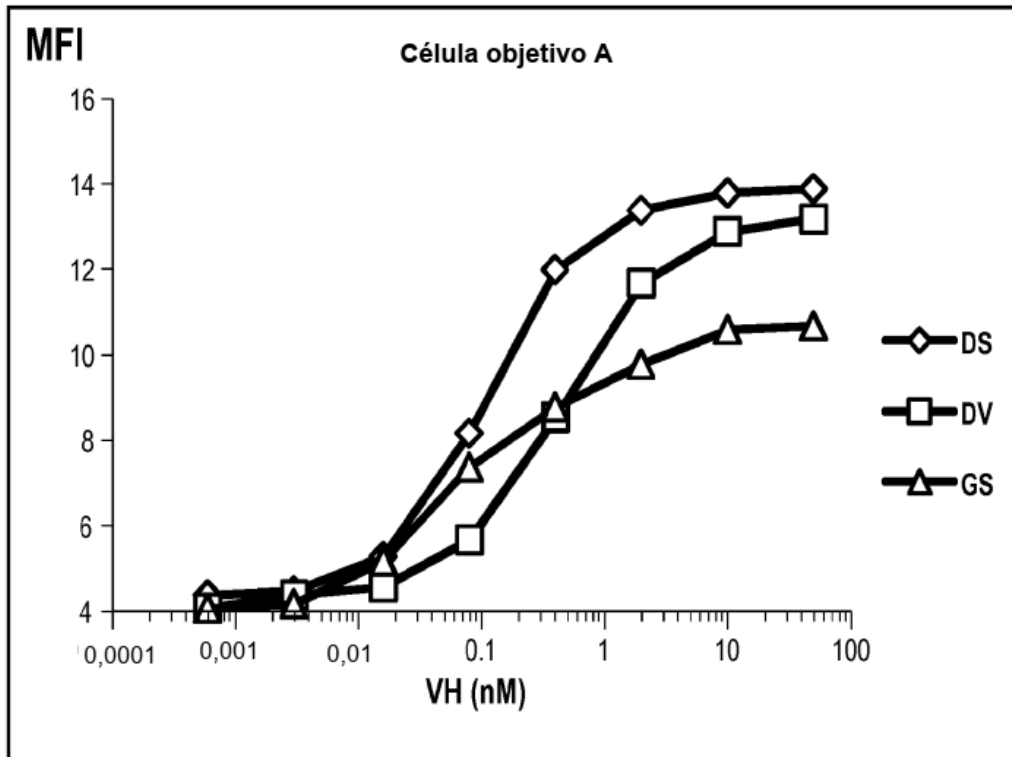


Fig. 6

Unión de alta afinidad de V_HS al tipo celular A



Clon	CE ₅₀ (pM)
DS	110
DV	430
GS	85

Fig. 8

Las selecciones dieron aglutinantes específicos para cada tipo de célula relacionada estrechamente

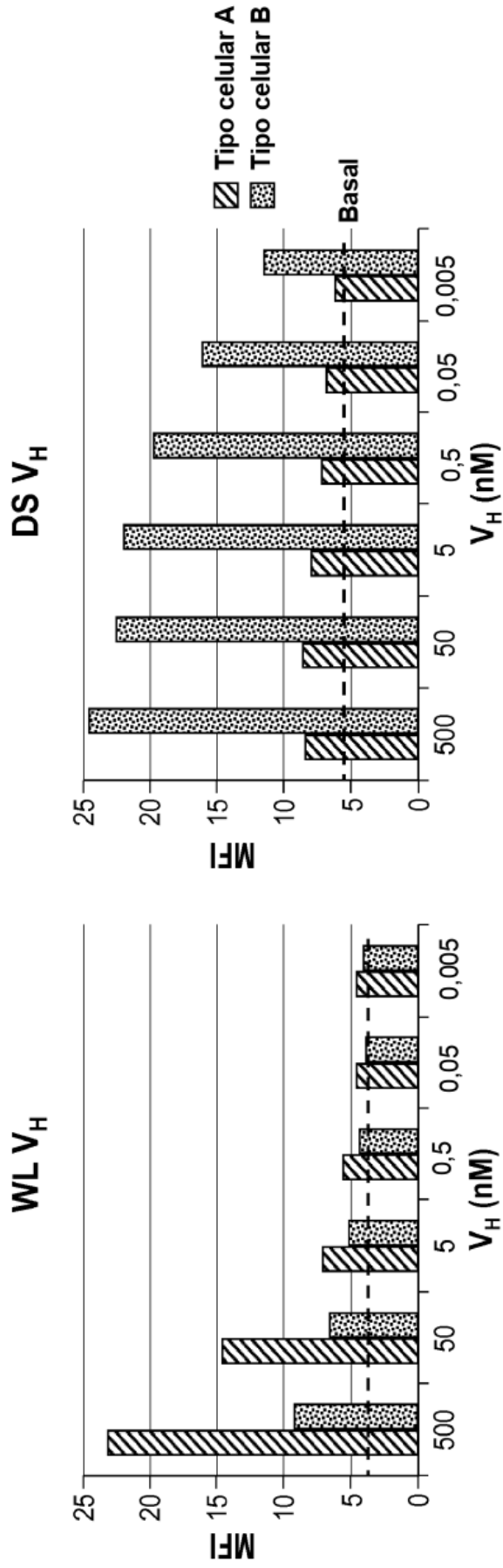


Fig. 9

Tres V_HS distintas que se unen selectivamente a la célula objetivo A y no a las células control B, C y D

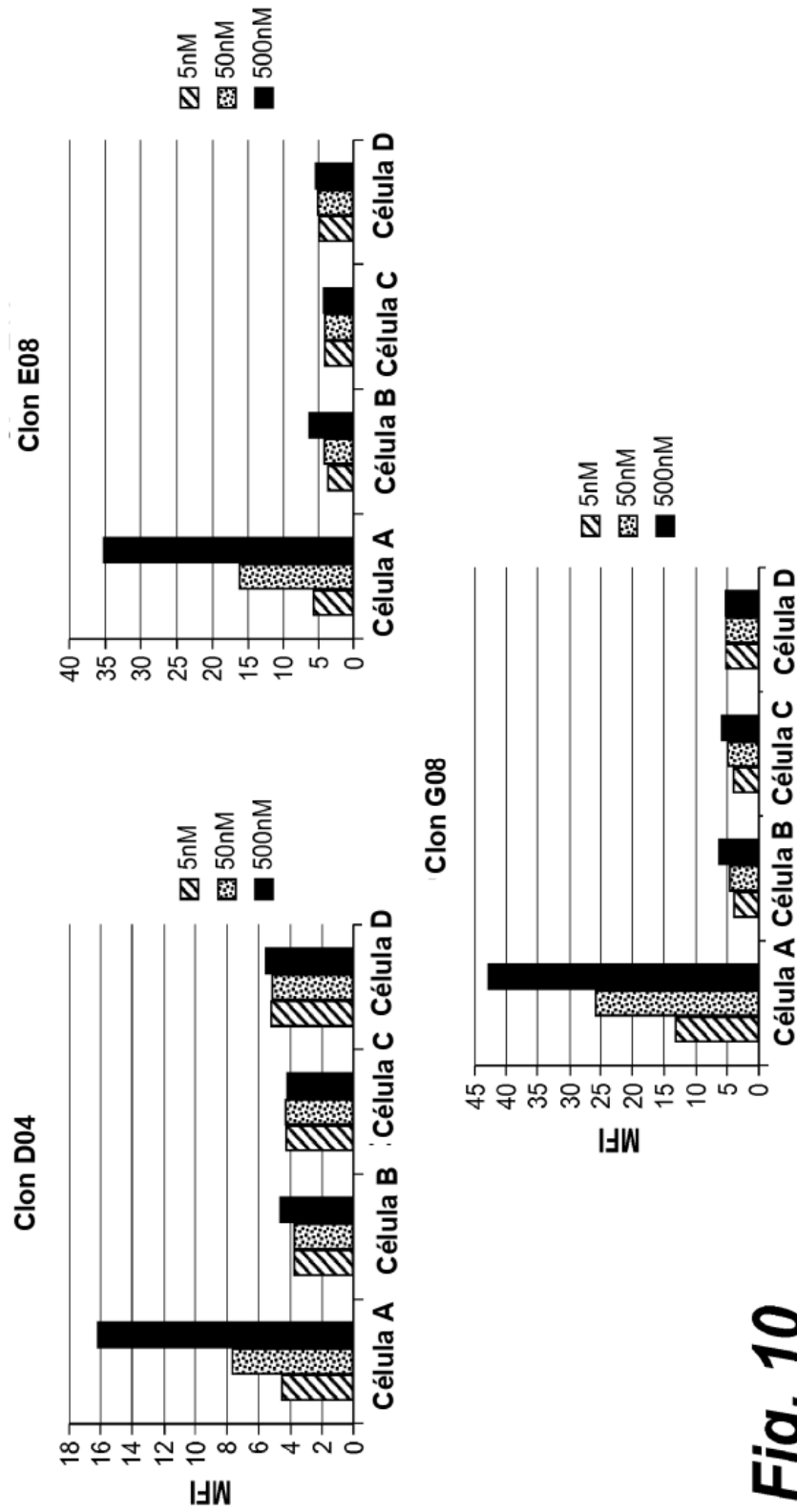


Fig. 10