



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 314 280**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03793817 .2**
(96) Fecha de presentación : **03.09.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1535069**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

(54) Título: **Método de investigación de bibliotecas de antilgandos para identificar antilgandos específicos para ligandos expresados diferencialmente y poco frecuentemente.**

(30) Prioridad: **04.09.2002 GB 0220506**

(73) Titular/es: **BioInvent International AB.**
223 70 Lund, SE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

(72) Inventor/es: **Frendeus, Björn**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

(74) Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 314 280 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de investigación de bibliotecas de antilíngandos para identificar antilíngandos específicos para ligandos expresados diferencialmente y poco frecuentemente.

La presente invención se refiere a métodos de investigación y en particular, a métodos de investigación de bibliotecas de antilíngandos para identificar antilíngandos específicos de ligandos expresados diferencial y/o poco frecuentemente.

Las bibliotecas basadas en proteínas o péptidos se utilizan con frecuencia para la selección de moléculas antilíngando con especificidad para ciertos ligandos.

Tales bibliotecas están construidas de manera que la molécula de proteína esté de alguna forma enlazada físicamente a la información genética que codifica a la molécula particular de proteína. La molécula de proteína se expone por tanto conjuntamente con su gen.

Los formatos de exposición comúnmente utilizados se valen de partículas hospedadoras de células o virus para presentar la molécula de proteína; e incluyen exposición bacteriana (Francisco *et al.*, 1993) y exposición de fagos (Smith, 1985; Smith y Scout, 1993; Winter *et al.*, 1994). Tales sistemas exponen la molécula potencial antilíngando en la superficie de la partícula hospedadora, mientras que la información genética de la molécula expuesta se alberga dentro de la partícula y dichos métodos han sido empleados con éxito para la selección de antilíngandos específicos basados en proteínas.

Existen otros formatos de exposición que se valen de la traducción *in vitro*; incluyendo diversas formas de exposición de ribosomas (Mattheakis *et al.*, 1994; Hanes y Pluckthun, 1997; He y Taussig, 1997) que se valen del vínculo no covalente de la información genética a la molécula de proteína, y otros formatos de exposición que también se valen de la traducción *in vitro*, en los que existe un vínculo covalente entre la información genética y la molécula potencial antilíngando de proteína, e.g. *the Profusion* (Weng *et al.*, 2002) o *the Covalent Display Technology* (Gao *et al.*, 1997).

Las bibliotecas antilíngando expuestas de péptido o proteináceas pueden ser totalmente aleatorias, e. g. cuando se utilizan las bibliotecas de péptidos, o pueden basarse en estructuras andamiaje de una región constante que incorporan una estructura adicional que confiere variabilidad.

Las estructuras andamiaje utilizadas a menudo se basan en los dominios variables de anticuerpos de cadena pesada y ligera (McCafferty *et al.*, 1990) pero pueden basarse también en otros andamiajes tales como la fibronectina (Jacobsson y Frykberg, 1995; Koide *et al.*, 1998), dominios de proteína A (Stahl *et al.*, 1989), o dominios pequeños estables de proteína e. g. BPTI (Markland *et al.*, 1991).

La selección de antilíngandos que exhiben una cierta especificidad de enlace, a partir de bibliotecas de exposición, se lleva a cabo a menudo utilizando los denominados métodos de “biocernido”.

El ligando objetivo puede estar inmovilizado en una superficie sólida y los miembros específicos antilíngando de una biblioteca se exponen al ligando objetivo inmovilizado para propiciar que los antilíngandos de interés se enlacen al ligando objetivo. Los miembros no enlazados de la biblioteca son arrastrados subsecuentemente y los antilíngandos de interés se recuperan y amplifican.

Las partículas proteináceas distintas de las de los miembros de la biblioteca antilíngando, e. g. fragmentos de anticuerpos que expresan fagos, pueden ser “pegajosos” resultando en el enlace y aislamiento de algunas moléculas no objetivo específicas. El enlace no específico puede minimizarse añadiendo ciertos compuestos a la mezcla antilíngando de exposición construcción/ligando para actuar como agentes bloqueadores para reducir este enlace de fondo de antilíngandos no específicos e. g. leche, albúmina de suero bovino (/humano/feto de becerro), gelatina y para ciertas aplicaciones (no celulares), detergente.

Se han diseñado diferentes procedimientos de lavado para reducir el enlace no específico de miembros de bibliotecas a células y para auxiliar en la separación de células de miembros contaminantes y/o no específicamente enlazados de bibliotecas.

Tales métodos incluyen el lavado de células sujetas magnéticamente en una columna (Siegel *et al.*, 1997), para minimizar las fuerzas de corte y para permitir el reenlace de fagos disociados. Otro método de lavado de células es mediante centrifugación en un medio de densidad superior tal como Ficoll o Percoll, para retirar selectivamente antilíngandos no específicos y de baja afinidad y separar aún más espacialmente células y antilíngandos enlazados de células de antilíngandos libres y antilíngandos no enlazados específicamente (Carlsson *et al.*, 1988; Williams and Sharon, 2002).

En dependencia de la eficiencia del proceso de selección, pueden requerirse varias rondas de cernido para eliminar o al menos reducir suficientemente antilíngandos no específicos a un nivel deseable (Dower *et al.*, 1991).

En otro método de selección, el(los) ligando(s) objetivo enlaza(n) a los miembros específicos de la biblioteca antiligando mientras que están en solución. Los antiligandos enlazados entonces se aíslan utilizando, por ejemplo, una etiqueta recuperable sujeta al ligando objetivo. La etiqueta de mayor uso común es biotina, que permite que se recupere el complejo entre la molécula objetivo y el miembro expuesto específico de la biblioteca utilizando avidina conjuntamente con un soporte sólido e.g. una perla magnética (Siegel *et al.*, 1997)

Estos métodos se utilizan cuando el ligando objetivo es bien conocido y está disponible en una forma purificada. Las selecciones contra un ligando objetivo único de por vez son de rutina. La selección de varios ligandos objetivo definidos puede llevarse a cabo simultáneamente. Los ligandos objetivo pueden ser uno o más de pequeños antígenos parciales, proteínas, carbohidratos, ADN y lípidos.

Para muchas aplicaciones, los antiligandos específicos son de interés contra ligandos expresados diferencialmente. Por ejemplo, las proteínas pueden ser expresadas diferencialmente en células y tejidos de pacientes con enfermedades, cuando se comparan con los de controles sanos. Tales enfermedades incluyen las microbianas, virales, o infecciones parasitarias, asma, trastornos inflamatorios crónicos y autoinmunes, cáncer, trastornos neurológicos, cardiovasculares o gastrointestinales. De manera similar, la composición de proteínas de fluidos corporales, e.g. plasma, líquido cerebroespinal, orina, semen, saliva y mucosidad, puede diferir entre pacientes con enfermedad comparados con los de controles sanos.

Consecuentemente, además de su aplicabilidad general como herramientas de investigación para identificar ligandos expresados diferencialmente, los antiligandos específicos para ligandos expresados diferencialmente pueden utilizarse como herramientas para uso en diagnósticos, prevención y/o tratamiento de enfermedades.

Avances recientes dentro de los campos genómicos y proteómicos han indicado la presencia de una multitud de moléculas todavía indefinidas expresadas diferencialmente, enfatizando la importancia de métodos para la generación de antiligandos específicos para estos ligandos objetivos potenciales.

Muchas de estas moléculas expresadas diferencialmente se espera que estén presentes en superficies celulares y por tanto constituyen objetivos potenciales para terapias objetivo utilizando, e. g. anticuerpos específicos que puedan conjugarse a agentes bioactivos (e. g. citotóxicos).

Las grandes bibliotecas altamente diversificadas de exposición antiligando brindan métodos de aislamiento de antiligandos con especificidad a ligandos celulares desconocidos de carbohidrato, proteína, lípido o acciones combinadas de éstos.

Los procesos de biocernido actualmente disponibles incluyen métodos basados en célula entera, porción de célula y membrana celular, que en principio, permiten el aislamiento de construcciones de exposición que exhiben antiligandos específicos a ciertos ligandos de membrana celular en su configuración original. Sin embargo, el éxito en el aislamiento de antiligandos contra ligandos expresados diferencialmente o ligandos de subpoblaciones celulares específicas (de Kruif *et al.*, 1995) ha sido limitado, y han estado ausentes medios racionales de diseño de experimentos para tener éxito en esta tarea.

Aún más, la selección de antiligandos a ligandos que difieren entre dos grupos de poblaciones de ligandos, e.g. células normales y transformadas, ha aislado primariamente aquellos antiligandos con especificidad contra ciertos ligandos expresados a un alto nivel de manera única en la célula objetivo, e. g. el antígeno de tumor Ep-CAM-1 (como se ha reportado extensamente en la literatura e. g. Huls *et al.*, 1999). Ha sido difícil producir antiligandos específicos hacia ligandos expresados en un nivel bajo o aquellos que son expresados diferencialmente.

Los métodos actualmente conocidos de selección y aislamiento de enlazadores a antígenos específicos no son capaces de aislar enlazadores para antígenos expresados en dos muestras diferentes pero a niveles de expresión diferentes. Aún más, los métodos actualmente conocidos no intentan optimizar las condiciones experimentales para la reacción de biocernido e.g. la reducción de rondas de biocernido o reactivos utilizados.

Stausbøl-Grøn *et al.* (1996) enseña el enriquecimiento de enlazadores que poseen una especificidad para antígenos distribuidos de manera única en una muestra y por tanto ausentes en una segunda muestra.

Stausbøl-Grøn *et al.* (2001) también enseña el enriquecimiento de enlazadores que poseen una especificidad para antígenos distribuidos de manera única en una muestra y ausentes de otras. Este documento representa una continuación del estudio anterior. En este estudio se ha alterado el método de enriquecimiento para utilizar un suero policlonal a fin de enmascarar antígenos comúnmente expresados. Sin embargo, este suero también enmascararía los antígenos comunes presentes en diferentes concentraciones en las dos muestras i. e. los antígenos expresados diferencialmente.

La WO 00/52 054 (de Genetech) enseña el aislamiento de enlazadores con especificidad al factor de aceleración de descomposición (CD55).

Por tanto, la presente invención pretende brindar métodos de identificación más eficientes y rápidos que eliminen o mitiguen los problemas antes mencionados asociados con métodos convencionales de identificación.

La invención posibilita: (i) aislamiento de enlazadores específicos para ligandos expresados diferencialmente, incluyendo ligandos que estén expresados y sobreexpresados a niveles bajos en una población de ligandos comparada con otra; y (ii) análisis diferencial de abundancia de ligandos a nivel de ligando, independiente de la naturaleza del ligando (e. g. carbohidrato, proteína, nucleótido, lípido o un conjugado de éstos).

En correspondencia con la invención se brinda un método de aislamiento de un antiligando a al menos a un ligando objetivo tal como se reivindica en la Reivindicación 1.

No se espera que los pasos de la presente invención tengan que llevarse a cabo necesariamente en un orden específico.

Al “brindar la cantidad determinada” incluimos el brindar una cantidad de ligando que ya fuera conocida de manera que las ecuaciones de la invención se han utilizado para verificar que la cantidad conocida brindada sea apropiada para aislar el(os) antiligando(s) deseado(s).

Los parámetros de reacción que se utilizan para un proceso de selección dado pueden optimizarse en correspondencia con la presente invención mediante cálculos aplicando la Ley de Acción de Masas y ecuaciones que de ésta se deriven, y tomando parámetros tales como la diversidad molecular de la biblioteca, número de copia de antiligando, límite de detección deseado de la sobreexpresación, afinidad de antiligando deseada y concentración de ligando a considerar.

La invención también brinda el método de aislamiento de al menos un antiligando a al menos un ligando objetivo como se reivindica en la Reivindicación 2.

El Paso (iv) y al menos uno de los pasos (v), (vi), (vii), (ix) y (x) pueden llevarse a cabo automáticamente.

Preferiblemente, el método también brinda el paso posterior de liberación del antiligando del segundo ligando objetivo para aislamiento y uso posterior.

Los pasos (ii) a (ix) pueden repetirse una o más veces, de ser necesario, para refinar aún más la pureza del antiligando aislado.

Es preferible que la presente invención brinde uno del primer ligando sustractivo o segundo ligando objetivo en una cantidad tal que esté en exceso, en comparación con el otro ligando.

Preferiblemente el exceso de ligando está entre 10 y 1000 veces.

La magnitud de exceso de la población de ligando sustractivo determina la “resolución” más elevada posible (i. e. en que medida usted es capaz de discriminar entre antiligandos con especificidad para ligandos que son de baja sobreexpresación, de sobreexpresación moderada, de alta sobreexpresación, o expresados de manera única) a la que usted será capaz de detectar, y en que medida usted podrá discriminar entre ligandos expresados de manera diferente. Por ejemplo, si está utilizando una biblioteca con 100 antiligandos específicos de ligando objetivo y añade concentraciones lo suficientemente grandes de ligandos positivos de manera que todos los antiligandos se enlazarán a ligandos en equilibrio, entonces un exceso en 10 veces de la población de ligando sustractivo le permitirá reducir la frecuencia de antiligandos con especificidad en un 90% para ligandos comúnmente expresados, mientras que un exceso de 200 veces (dos veces el número de enlazadores antiligando específicos) le permitirá la eliminación de enlazadores comunes (véanse figura 5 y el último párrafo del ejemplo 4).

Los medios de separación del primer ligando sustractivo y/o segundo ligando objetivo son preferiblemente al menos uno seleccionado de entre un sostén sólido, membrana celular y/o porciones de ésta, membrana sintética, perlas, etiquetas químicas y ligandos libres en solución.

Todavía de mayor preferencia los medios de separación son membranas celulares y/o porciones de éstas.

Aún de mayor preferencia, el primer ligando sustractivo y segundo ligando objetivo se fijan a o se incorporan dentro de los medios de separación de diferentes densidades.

De mayor preferencia el primer ligando sustractivo tiene medios de separación que comprenden una vesícula membranosa y el segundo ligando objetivo tiene medios de separación que comprenden una membrana celular entera.

Preferiblemente el método de separación es uno de centrifugación por densidad (Williams y Sharon, 2002), secuestro con soporte sólido, secuestro con perlas magnéticas (Siegel *et al.*, 1997), enlace de etiqueta química y partición de fase acuosa.

De mayor preferencia el método de separación se lleva a cabo mediante centrifugación por densidad sobre un gradiente de densidad, e. g. Ficoll; Percoll; medio gradiente yodado, en el que durante la centrifugación, los primeros y segundos ligandos objetivo se mueven a través del gradiente Ficoll en diferentes magnitudes mientras que los primeros y segundos ligandos objetivo pueden aislarse de sus puntos extremos que difieren.

De mayor preferencia el método de separación utiliza un gradiente de polímero de sacarosa, e.g. Ficoll.

Preferiblemente la biblioteca investigada es una biblioteca de exposición en la que el antiligando de interés se expresa por y se expone sobre la superficie de un miembro de la biblioteca. De mayor preferencia la biblioteca es una biblioteca de exposición de fagos en la que el antiligando se expone sobre la superficie de un bacteriófago.

La exposición de proteínas y polipéptidos sobre la superficie de bacteriófago (fago), fusionada a una de las proteínas de recubrimiento de fagos, brinda una herramienta poderosa para la selección de ligandos específicos. Esta técnica de “exposición de fagos” se utilizó originalmente por Smith en 1985 para crear grandes bibliotecas de anticuerpos con el objetivo de seleccionar aquellas con gran afinidad para un antígeno particular. Más recientemente, el método ha sido empleado para presentar péptidos, dominios de proteínas y proteínas intactas en la superficie de fagos para identificar ligandos que tengan propiedades deseadas.

Los principios detrás de la tecnología de exposición de fagos son como sigue:

(i) ácido nucleico que codifica la proteína o polipéptido para exposición se clona hacia un fago;

(ii) el ácido nucleico clonado se expresa fundido a la parte de anclaje de recubrimiento de una de las proteínas de recubrimiento de fagos (típicamente las proteínas de recubrimiento p3 o p8 en el caso de fago filamentoso) tal que la proteína extranjera o polipéptido se exponga sobre la superficie del fago;

(iii) El fago que expone la proteína o polipéptido con las propiedades deseadas se selecciona entonces (e. g. por cromatografía de afinidad) brindando por tanto un genotipo (vinculado a un fenotipo) que puede ser secuenciado, multiplicado y transferido a otros sistemas de expresión.

De manera alternativa, la proteína extranjera o polipéptido puede expresarse utilizando un vector fagémido (i.e. un vector que comprenda los orígenes de replicación derivados de un fago y un plásmido) que puedan empacarse como un ácido nucleico de hebra sencilla en un recubrimiento bacteriófago. Cuando se emplean vectores fagémidos, se utiliza un “fago de apoyo” para suministrar las funciones de replicación y empaque del ácido fagémido nucleico. El fago resultante expresará tanto la proteína de recubrimiento de tipo natural (codificada por el fago de apoyo) como la proteína de recubrimiento modificada (codificada por el fagémido), mientras que solo la proteína modificada de recubrimiento se expresa cuando se utiliza un vector de fagos.

El uso de exposición de fagos para aislar ligandos que enlazan moléculas biológicamente relevantes ha sido resenado en Felici *et al.* (1995), Katz (1997) y Hoogenboom *et al.* (1998). Diversas bibliotecas combinatorias aleatorias de péptidos han sido construidas para seleccionar polipéptidos que enlazan diferentes objetivos, e.g. receptores de superficie celular o ADN (Kay y Paul), 1996).

Proteínas y proteínas multiméricas han sido fago-desplegadas con éxito como moléculas funcionales (véanse Chiswell y McCafferty, (1992). Adicionalmente, fragmentos funcionales de anticuerpos (e. g. Fab., Fv de cadena sencilla Fv [scFv]) han sido expresados (McCafferty *et al.* (1990); Barbas *et al.* (1991); Clackson *et al.* (1991)) y algunas de las desventajas de la tecnología de anticuerpos monoclonales humanos han sido superadas ya que se han aislado fragmentos de anticuerpos humanos de alta afinidad (Marks *et al.* (1991) y Hoogenboom y Winter (1992)).

Información ulterior sobre los principios y práctica de la exposición de fagos se brinda en *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual* Ed Kay, Winter y McCafferty (1996), cuya presentación se incorpora aquí como referencia.

Los ligandos sustractivo y objetivo preferentes incluyen antígenos, ligandos receptores y objetivos de enzimas que comprenden al menos uno de entre carbohidrato, proteína, péptido, lípido, polinucleótido, moléculas inorgánicas y moléculas conjugadas.

Los antiligandos preferentes que componen la biblioteca antiligando de la presente invención incluyen anticuerpos y variantes de enlace de antígenos, derivados o fragmentos de éstos; moléculas andamiaje con superficies estructuradas variables; receptores; y enzimas.

Aún de mayor preferencia, el ligando y sus medios de separación se exponen a un estímulo que influye en la expresión de los ligandos objetivo sobre dichas construcciones de ligando, para investigar los antiligandos específicos para cambios en la expresión de ligando en situaciones dadas.

Los antiligandos seleccionados identificados mediante la presente invención pueden subsecuentemente utilizarse en la producción de una composición farmacéutica para uso en medicina para el tratamiento, imagen, diagnóstico o pronóstico de enfermedad. Los antiligandos basados en anticuerpos y más importante en anticuerpos humanos tienen gran potencial terapéutico.

Un aspecto ulterior de la presente invención, se ejemplifica mediante el uso de medios computarizados para llevar a cabo el método de la presente invención, e incluye además un producto de programa informático, que comprende un

medio informático de lectura con medios adaptados de codificación mediante programa informático, de manera que cuando dicho programa se carga en un ordenador, hace que el ordenador ejecute el procedimiento del método.

Adicionalmente la presente invención incluye un programa informático, distribuible mediante transmisión electrónica de datos, que comprende medios adaptados de codificación mediante programas, de manera que cuando dicho programa se carga en un ordenador, hace que el ordenador ejecute el procedimiento del método.

Definiciones

Mediante “biocernido” queremos señalar un método de selección de un miembro de un par deseado de enlace antiligando-ligando, basado en su capacidad para enlazar con gran afinidad al otro miembro.

Mediante “ligando” incluimos el significado de un miembro de un par de enlace ligando/antiligando. El ligando puede ser por ejemplo, una de las hebras de ácido nucleico en un par complementario, de enlace dúplex hibridizado de ácido nucleico; una molécula efectora en un par de enlace efector/receptor; o un antígeno en un par de enlace antígeno/anticuerpo o fragmento de antígeno/anticuerpo.

Mediante “antiligando” incluimos el significado del miembro opuesto de un par de enlace ligando/antiligando. El antiligando puede ser el otro(a) de las hebras de ácido nucleico en un par de enlace dúplex de ácido nucleico hibridizado, complementario, la molécula receptora en un par de enlace efector/receptor; o un anticuerpo o molécula de fragmento de anticuerpo en par de enlace antígeno/anticuerpo o antígeno/fragmento de anticuerpo, respectivamente.

Mediante “antígeno” incluimos el significado de una molécula o compuesto químico que es capaz de interactuar con anticuerpos pero no necesariamente producir una respuesta inmune. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a moléculas de proteína, péptido, nucleótido, carbohidrato, lípido o un conjugado de éstos.

Mediante “ligandos expresados diferencialmente” indicamos ligandos que se expresan o a niveles que difieren entre las fuentes objetivos y sustractivas, incluyendo aquellas expresadas solo en ciertas condiciones/lugares y no en otros; o donde el ligando objetivo o el sustractivo es una versión modificada del otro a partir de ligandos objetivo o sustractivos. Por ejemplo, algunos antígenos se expresan a un alto nivel sobre las superficies celulares de células enfermas (e. g. células cancerosas y a bajos niveles o no del todo en las células sanas equivalentes (e. g. células no cancerosas).

Mediante “ligandos de baja expresión” indicamos aquellos ligandos que se expresan a bajos niveles i.e. menos de 20.000 copias por célula (esto incluye la mayoría de los receptores naturales expresados de superficie celular) o ligandos que ocurren a una frecuencia de menos del 1% respecto a cualquier otro ligando de mayor expresión en la muestra de población de ligandos positivos.

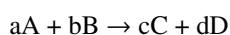
Mediante “construcción de ligandos” indicamos un sistema que comprende ligandos objetivos y/o sustractivos asociados con medios de separación.

El término “variante de anticuerpo” debe tomarse para referirse a cualesquiera anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes o híbridos de anticuerpo, tales como, pero no limitados a, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla producida por exposición de fagos de variable de cadena ligera y/o pesada de inmunoglobulina y/o regiones constantes, u otra molécula inmunointeractiva capaz de enlazar a un antígeno en un formato de inmunoensayo que es conocido por parte de los expertos en la técnica.

El término “derivado de anticuerpo” se refiere a cualquier molécula modificada de anticuerpo que es capaz de enlazar a un antígeno en un formato de inmunoensayo conocido por aquellos expertos en la técnica, tal como un fragmento de un anticuerpo (e.g. fragmento Fab o Fv), o una molécula de anticuerpo que es modificada mediante la adición de uno o más aminoácidos u otras moléculas para facilitar el acople de los anticuerpos a otro péptido o polipéptido, a una proteína portadora grande o a un sostén sólido (e.g. los aminoácidos tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y derivados de éstos, grupos acetilo-NH₂ o grupos amido-COOH terminales, entre otros).

Mediante “centrifugación de densidad” indicamos la separación de ítems e.g. células, organelas y macromoléculas según sus diferencias de densidad. Esta separación se logra mediante centrifugación utilizado un gradiente de densidad de una solución apropiada, a través del cual los ítems a separar se mueven (desplazan) sobre la base de su densidad.

La “Ley de Acción de Masa” es una ley universal de la naturaleza aplicable bajo cualquier circunstancia. Esta ley establece que para la reacción:



y si ese sistema está en equilibrio a una temperatura dada, entonces la siguiente proporción es una constante:

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

donde:

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

a, b, c, & d = los coeficientes necesarios para una ecuación química balanceada

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

Mediante “conjunto(s) de datos” indicamos un conjunto de información que describe el compuesto en una forma apropiada para darle entrada en un ordenador para procesamiento automático de esa información. La información brindada puede, por ejemplo, referirse al número de moléculas antiligos.

Mediante “determinación automática” indicamos el uso de ecuaciones derivadas de la ley de acción de masa, mediante un ordenador u otro dispositivo automatizado, para determinar a partir de los datos brindados, las cantidades de ligando necesarias para llevar a cabo la presente invención.

Descripción de las realizaciones preferentes y de los dibujos

Los ejemplos que incorporan ciertos aspectos de la presente invención se describen ahora, con referencia a las siguientes figuras en las cuales:

Figura 1 - La captura de antiligos complejos a ligandos como una función de densidad de ligando objetivo donde: $K_d = 10$ nM, número de copias de ligando objetivo antiligo específico (A) = 200, Volumen = 2,5 ml.

Figura 2 - La captura de molécula antiligo sobre construcciones de ligandos objetivos como una función de 1) el número de ligandos expresados sobre las construcciones de ligandos sustractivos y objetivos respectivamente y 2) el número de construcciones de ligandos objetivos y sustractivos utilizados en el proceso de selección. Los números indicados representan la captura de antiligos (sobre construcciones de ligandos objetivos) con especificidad para ligandos representados en la Tabla I. Los parámetros de reacción $K_d = 10$ nM, número de copias de ligandos objetivos específicos a antiligos T = 200 para todas las especificidades antiligo, volumen (V) = 2,5 ml.

Figura 3 - Captura de antiligo sobre células objetivo como una función de especificidad y afinidad antiligo. Categorías de antígenos como se describen en la Tabla 1. Entrada de célula objetivo (C_p) es 5×10^7 , entrada de célula sustractiva (C_s) es 10^{10} , volumen (V) es 2,5 ml y asumiendo una entrada de ligando antiligo específico (A) de 200.

Figura 4 - Histograma que muestra frecuencias de especificidad antiligo como una función de exceso de ligando sustractivo (células) añadida y el número de rondas de selección realizadas. Histogramas que muestran los números de antiligos aislados con diferentes especificidades. Aplican los parámetros de reacción de la Figura 2.

Figura 5 - Abundancia de población objetivo de ligandos independiente, pero abundancia de población de ligandos objetivos a sustractivos dependiente de aislamiento de antiligos con especificidad para ligandos de diferente abundancia dentro de población de ligandos objetivos y entre poblaciones de ligandos objetivos y sustractivos como se describe en la Tabla 2. Los parámetros de reacción de la Figura 2 se aplican y el exceso de población de ligandos sustractivos es x 200 como se describe en el ejemplo 4.

Figura 6 - La elución de fago específico CD40L y de fago enlazador general de fibroblastos de ratón luego de selección de células de fibroblastos de ratón no transfectadas (3T3), células de fibroblastos de ratón transfectadas CD32 (CD32-3T3) o células de fibroblastos de ratón transfectadas CD40L (CD40L-3T3). Las líneas de puntos muestran el número teórico de fagos específicos CD40L enlazados a células CD40L-3T3 en equilibrio dado un número de entrada de partícula específica CD40L de fagos de 10^5 o 10^6 y parámetros utilizados en el proceso de selección.

Figura 7 - Números (Figura 7A) y proporciones (figura 7B) de partículas específicas de fago CD40L a fago enlazador general de fibroblastos (determinado por cfu después de infección de *E. coli* HB101F' y colocado en placas LA contentivas de antibióticos apropiados), luego de selección en ausencia de ligandos sustractivos (solamente células CD40L-3T3), preselección utilizando un exceso en cuatro veces de células 3T3 transfectadas a partir de CD32, y preselección utilizando un exceso en cincuenta veces de membranas celulares de células 3T3 transfectadas a partir de CD32.

Figura 8 - Reactividad de clones scFv de clones de célula B (Ramos) versus célula T (Jurkat): (Figura 8A) Proporción de impacto de clones seleccionados luego de tres rondas de biocernido de concurrencia utilizando la presente

invención. (Figura 8B). Proporción de impacto de clones seleccionados luego de tres rondas de preselección convencional negativa (célula T) y luego de selección positiva (célula B). Eje Y = reactividad de células B de clones (conteos * intensidad de fluorescencia). Eje X = reactividad de células T de clones (conteos * intensidad de fluorescencia). Enlace ScFv examinado utilizando un instrumento FMAT macro confocal de identificación de elevada productividad.

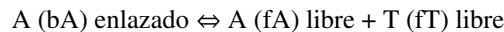
Ejemplo 1

Derivando Ecuaciones

Aplicando la Ley Universal de Acción de Masas (LMA), puede calcularse el número de ligandos necesarios para aislar antiligandos a ligandos de baja expresión y/o ligandos expresados diferencialmente a partir de bibliotecas de exposición de alta diversidad.

La LMA establece que el enlace irreversible no covalente (enlace de hidrógeno, electrostático, Van der Waals o fuerzas hidrofóbicas) entre un antiligando A y su ligando objetivo T, y su complejo AT está dado por la interacción en equilibrio $A + T \rightleftharpoons AT$ con la constante de disociación de equilibrio o afinidad $K_d = [A][T]/[AT]$.

La interacción en equilibrio entre antiligandos con especificidad idéntica (A) para un ligando objetivo (T) puede describirse como



con:

$$K_d = \frac{[fA] \times [fT]}{[bA]} \quad (I)$$

Se conoce que el total de A o de T es la suma de A o T libre y enlazado

i.e. $[A] \text{ (Total A)} = [fA] + [bA]$, y $[T] \text{ (Total T)} = [fT] + [bA]$

Por tanto en (I) reemplazando $[fA]$ por $[A] - [bA]$, y $[fT]$ por $[T] - [bA]$

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

Que se reordena para formar

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

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

Esta ecuación simultánea tiene la solución

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

donde la raíz negativa es la relevante:

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

Sustituyendo concentraciones para números de partícula/el número de partículas por mol (C)/unidad de volumen (V) se obtiene

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

y simplificada

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

donde

A= número total de antiligandos A

T= número total de ligandos T

V= constante de Avogrado (6,022x10²³ partículas/mol)

Dado que la LMA se aplica a cada reacción entre diferentes antiligandos con afinidad y especificidad dada para sus respectivos ligandos objetivos, el número de antiligandos enlazados a ligandos después de un proceso de selección puede calcularse aplicando la LMA y la ecuación (III).

Además, si no hay diferencia cualitativa entre los antiligandos asociados con las poblaciones de ligandos sustractores u objetivo, i.e. que no hay cambio en las propiedades físico químicas del ligando durante el método, entonces el número de antiligandos que han enlazado a ligandos objetivo en equilibrio será igual al número total de antiligandos enlazados multiplicado por la proporción de ligandos objetivo en construcciones de ligandos objetivo a ligando total (ligando sustractivo y objetivo):

Introduciendo:

C_p= el número de construcciones de ligando objetivo

C_s= el número de construcciones de ligando sustractivo

T_p = el número de ligandos T en C_p

T_s = el número de ligandos T en C_s

Si las construcciones objetivo y sustractivo se mezclan entonces el número total de ligandos será:

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

Y el número de antiligandos (A) enlazados a las construcciones positivas en equilibrio (bA_p) está dado por:

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

Además la combinación de ecuaciones (III) y (IV) arroja:

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

Ejemplo 2

Optimizando concentraciones de ligandos

5 Las ecuaciones ejemplificadas en el ejemplo 1 muestran que la utilización de altas concentraciones tanto del primer ligando sustractivo y del segundo ligando objetivo son importantes en la recuperación eficiente de antiligandos con especificidad para ligandos de baja expresión y diferencialmente expresados, así como para la reducción de antiligandos con especificidad para ligandos comúnmente expresados.

10 La concentración de ligandos puede incrementarse por diversos medios. En todos los casos la concentración de ligando se aumenta desplazándose del acople bidimensional de ligando (acople a una fase sólida bidimensional) al uso de ligando libre en suspensión o solución (tridimensional).

15 En casos donde el enlace es dependiente de que el ligando utilizado esté en su configuración original, tal como los ligandos de superficie celular, entonces la concentración de ligando se maximiza incrementando la proporción de área superficial de construcción de ligando a volumen de construcción de ligando.

20 Por ejemplo, los antígenos de superficie celular pueden utilizarse en la forma de pequeñas vesículas de membranas de plasma libres en suspensión, en oposición al uso de células completas sujetas a una superficie bidimensional. Esto tiene la ventaja adicional de aumentar la estabilidad del ligando en suspensión o solución, promoviendo por tanto la interacción de equilibrio ligando-antiligando.

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

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

30 donde

A_p = área de la esfera

V_p = volumen de la esfera

35 i.e. a menor radio de la esfera, mayor la proporción de ligandos/volumen y ligando de más partículas (tipo suspensión).

Ejemplo 3

Probando la ecuación III

45 Las bibliotecas moleculares altamente diversificadas, tales como las bibliotecas de fago exposición, típicamente comprenden algunos 1×10^{10} miembros de bibliotecas de genotipos únicos. Al considerar una biblioteca de fagos, un caldo típico de biblioteca de 2,5 ml (Volumen - V) contiene un total de 2×10^{13} proteínas expuestas, significando que cada miembro individual de la biblioteca tiene 2.000 proteínas expuestas, i.e. que cada genotipo está representado por 2 000 copias. Como promedio, un 10% de estas partículas (200) (antiligandos objetivo específicos - A) puede estimarse que expone capacidad de enlace de ligando.

50 La inserción de estos parámetros en la ecuación III y el uso de una afinidad de enlace deseada de un buen antiligando ($K_d \leq 10$ nM), el número mínimo de ligandos (T) necesarios para "capturar" (bA - antiligandos enlazados) un número dado de antiligandos de genotipo específico puede calcularse aplicando la ecuación III (Figura 1).

55 Cuando se utilizan células como la fuente de ligandos, estos parámetros bordean aquello que es prácticamente factible utilizando células enteras en procedimientos convencionales de biocernido. El número de células que pueden suspenderse en un volumen de 2 ml es finito, ya que el incremento del número de células resulta en una viscosidad incrementada del medio, fuerzas de corte y deterioro de la interacción de la afinidad de equilibrio entre antiligando y ligando objetivo. La superación de estos problemas mediante los métodos de la presente invención permite el aislamiento de antiligandos a ligandos de baja expresión presentes en solo una minoría de células dentro de una población celular heterogénea.

60 Al intentar aislar los antiligandos que son específicos para ligando(s) que son más abundantes en una población de ligandos comparada con otra - e.g., antígenos en células de cáncer versus células no cancerosas - hay una demanda aún mayor de utilización de altas concentraciones de antígeno en una forma controlada. En una biblioteca molecular altamente diversificada existirán en principio, antiligandos para cada ligando presente en la mezcla. Los antiligandos específicos para ligandos únicos o sobrerregulados requieren del enriquecimiento relativo a antiligandos comunes.

ES 2 314 280 T3

El enriquecimiento puede alcanzarse mediante un procedimiento de biocernido de concurrencia en el cual se añaden en exceso ligandos de la población de control.

Una biblioteca molecular contiene antilípidos con especificidad a un gran número de diferentes ligandos cuyas concentraciones difieren entre dos mezclas dadas de complejo de ligandos - ejemplificada aquí por, pero no restringida a, - como se muestra en la Tabla I.

Se asume además que los ligandos sobreexpresados o únicos son poco frecuentes en comparación con ligandos distribuidos de manera similar entre las construcciones de células de ligando sustractivo y objetivo (indicado en la Tabla I por representantes de antilípidos 100 mil veces mayores para categorías de ligando TN1 y TN2).

En la Tabla I, los antígenos (ligando) se dividen en categorías en base a su expresión absoluta y relativa entre construcciones de ligando objetivo y sustractivo. En este ejemplo, las construcciones de ligando son células, y se asume que dos poblaciones diferentes de células difieren en su expresión de ciertos antígenos, pero también comparten expresión de otros ciertos antígenos.

Antígenos que pertenecen a las categorías TR1 y TR2 son expresados solo en células objetivo (TR=célula objetivo restringida); antígenos de las categorías TE1, TE2, TE3 y TE4 son expresados y enriquecidos a diferente nivel sobre células objetivo cuando se comparan con las células sustractivas; y antígenos objetivo que pertenecen a las categorías TN1.X y TN2.X son aquellos antígenos expresados a densidades iguales tanto sobre células objetivo como sustractivas, pero a diferentes números absolutos por célula.

Es más, se asume que antígenos expresados a iguales densidades sobre células objetivo y sustractivas (TN1.X y TN2.X) son 100 mil veces más comunes que la célula objetivo enriquecida (TE) o antígenos únicos (TR).

TABLA I

Categorías de molécula antilípido por antígeno célula positiva y prevalencia de antígeno célula sustractiva

Categoría antilípido	Especificidad antilípido	Expresión célula positiva (antígenos/célula) Tp	Expresión célula sustractiva Ts
R1 ■	Antígeno TR1	1.000.000	0
R2 ■	Antígeno TR2	100.000	0
E1 ■	Antígeno TE1	50.000	1.000
E2 ■	Antígeno TE2	50.000	10.000
E3 □	Antígeno TE3	10.000	1.000
E4 ■	Antígeno TE4	5.000	1.000
N1.1-N1.100 000 □	Antígeno TN1.1- TN1.100 000	100.000 (x100.000)	100.000 (x100.000)
N2.1-N2.100 000 ■	Antígeno TN2.1- TN2.100 000	1.000.000 (x100.000)	1 000.000 (x100.000)

Ejemplo 4

Probando la ecuación V

Si los antilípidos R1, R2, N1 y N2 derivados de una biblioteca molecular altamente diversificada se mezclan con sus respectivos antígenos objetivo TR1, TR2, TN1 y TN2, y en los que ocurre la expresión diferencial sobre células objetivo y sustractivas, entonces el número de antilípidos enlazados a células positivas en equilibrio está dado por

$$b_{R1p} = \left\{ \frac{(R1 + TR1 + (K_d) \times (C \times V))}{2} - \sqrt{\frac{(R1 + TR1 + (K_d) \times (C \times V))^2}{4} - R1 \times TR1} \right\} \times \left\{ \frac{(TR1, xC_p)}{((TR1, xC_p) + (TR1, xC_s))} \right\}$$

$$b_{N1p} = \left\{ \frac{(N1 + TN1 + (K_d) \times (C \times V))}{2} - \sqrt{\frac{(N1 + TN1 + (K_d) \times (C \times V))^2}{4} - N1 \times TN1} \right\} \times \left\{ \frac{(TN1, xC_p)}{((TN1, xC_p) + (TN1, xC_s))} \right\}$$

y así sucesivamente.

Sustituyendo los números de antígeno TR1, TR2, TE1, ..., TE4, TN1 y TN2 con los números mostrados en la Tabla I, y manteniendo todos los otros parámetros constantes y como se describió anteriormente, el número de antilíngandos específicos para diferentes categorías de antígenos que están enlazados a antígeno de célula objetivo (población) en equilibrio, siguiendo selección competitiva, puede calcularse como una función de células objetivo y células sustractivas añadidas (Figura 2).

En esencia la Figura 2 demuestra lo siguiente:

- La adición incrementada de ligando objetivo resulta en el aislamiento de números incrementados de antilíngandos con especificidad para:
 - a) Ligandos sobreexpresados de célula objetivo y ligandos únicos de célula objetivo; y
 - b) Ligandos menos abundantes sobreexpresados de célula objetivo.
- La adición incrementada de células sustractivas resulta en una mejor substracción (retiro) de antilíngandos con especificidad a ligandos expresados a densidades iguales sobre células objetivo y células sustractivas, de manera que, a concentraciones de ligando suficientemente elevadas y proporciones entre célula objetivo y sustractivas, todos los antilíngandos con especificidad a ligandos comúnmente expresados serán enlazados a las células sustractivas (e.g. Figura 2 - 5×10^7 células objetivo y 1×10^{10} células sustractivas).

En el ejemplo anterior, y dado los parámetros de reacción de la figura 2, para que los antilíngandos con especificidad para todos los ligandos sobreexpresados de célula objetivo (incluyendo la categoría E4 de antígenos de baja expresión y baja sobreexpresación) a ser aislados, se necesita utilizar 5×10^7 células positivas en el proceso de selección.

Un exceso de ligando sustractivo de doscientas veces (1×10^{10}) agotará todo antilíngando con especificidad para ligandos comúnmente expresados mientras que se retienen antilíngandos con especificidad para todos los ligandos únicos o sobreexpresados de célula objetivo.

En un esquema de proceso de selección diferente, en el que el número de copia de antilíngando no se mantiene constante, la utilización de 5 000 copias de antilíngando (de genotipo idéntico o diferente) contra cada ligando requeriría 1×10^6 células objetivo y 5×10^9 células sustractivas para poder capturar antilíngandos de todas las especificidades deseadas y el retiro de antilíngandos con especificidad para todos los ligandos comúnmente expresados.

Para el agotamiento de antilíngandos con especificidad para ligandos comúnmente expresados, la proporción de construcción de ligandos objetivos a sustractivo utilizada en el proceso de selección necesita exceder el número total de antilíngandos enlazados con especificidad para los ligandos comúnmente expresados más elevados.

El umbral para tal agotamiento puede determinarse empíricamente dosificando la entrada del miembro de la biblioteca (de una biblioteca molecular altamente diversificada) para el proceso de selección. Si se cumplen los criterios anteriores, solo antilíngandos con especificidad para célula objetivo enriquecida o ligandos únicos de célula objetivo, predominarán sobre antilíngandos con especificidad para ligandos comúnmente expresados independientemente de sus afinidades (Figura 3).

Antilíngandos de baja afinidad ($K_d = 1 \mu M$ en la Figura 3) que se adhieren a las células son entonces capaces de ser arrastrados. Debido a efectos de viscosidad, fuerzas de corte incrementadas y deterioro de la reacción de equilibrio entre ligando y antilíngando, el número de células necesarias para cumplir estos criterios excede lo que es factible utilizando células enteras, bibliotecas moleculares actualmente disponibles y técnicas de biocernido establecidas.

Como alternativa al agotamiento inmediato de todos los antilíngandos con especificidad para ligandos comúnmente expresados de población objetivo/población sustractiva, pueden realizarse múltiples rondas de selección para enriquecer respecto a antilíngandos con especificidad para ligandos presentes de manera única o sobreexpresada sobre la célula objetivo. En dependencia de la calidad de la biblioteca antilíngando, la abundancia esperada del ligando objetivo de interés, y de la capacidad de construcción de ligandos sustractivo, puede resultar útil tal metodología.

Las proporciones entre antilíngandos con diferentes especificidades aumentan exponencialmente con el número de rondas de selección. Si la concentración total de ligando objetivo (A) es mucho mayor que la concentración de moléculas de antilíngando libre (fT) ($[A] \gg [fT]$), como es el caso en cualquier proceso dado de selección que utiliza bibliotecas moleculares altamente diversas, entonces la concentración de ligando libre puede reemplazarse por la concentración total de ligando ($[fT] \approx [T]$) arrojando $K_d \approx [fA] \times [T]/[bA]$. Reemplazando $[fA]$ por $[A] - [bA]$ arroja $\approx ([A] - [bA]) \times [T]/[bA]$ y reagrupado a $[bA] \approx [A] \times [T]/(K_d + [T])$.

Reemplazando concentraciones para números de partícula/número de partículas por mol (C)/volumen (V), el número de antilíngandos capturados se obtiene como $bA \approx AxT/(CxVxK_d + T)$.

Si se mezclan células objetivo con células sustractivas, el número de antilíngandos capturados sobre células objetivo (bA_p) está dado por $bA_p \approx bA \times (T_p \times C_p)/T_{Tot} \approx A \times T_{Tot}/(C \times V \times K_d + T_{Tot}) \times (T_p \times C_p)/T_{Tot} \approx A/(C \times V \times K_d + T_{Tot}) \times (T_p \times C_p)$.

$$bA_p \approx \left(\frac{AxT_{tot}}{CxVx(K_d + T_{tot})} \right) x \left(\frac{T_p x C_p}{(T_p x C_p) + (T_s x C_s)} \right) \quad \text{VI}$$

Sí:

$$\left(\frac{T_{tot}}{CxVx(K_d + T_{tot})} \right) x \left(\frac{T_p x C_p}{(T_p x C_p) + (T_s x C_s)} \right)$$

es constante entre rondas de selección (parámetros de reacción diferentes de la entrada antiligando (A_{in})) e igual a α para la interacción del antiligando_A - ligando_A y β para antiligando_B - ligando_B, entonces el número de antiligandos capturados en la selección 1 específica para ligando_A está dada por $a1=A_{in} \times \alpha$, y los antiligandos capturados específicos para el ligando_B están dados por $b1=B_{in} \times \beta$.

De manera similar, siguiendo la amplificación x -veces de antiligando eluido el número de antiligandos capturados sobre ligandos de célula objetivo A o B en la ronda de selección 2 está dado por $a2= x*a1=x* A_{in} \times \alpha \times \alpha$ y $b2= x*b1=x* B_{in} \times \beta \times \beta$.

En la ronda de selección 1 la proporción de antiligandos capturados específicos para ligando_A a antiligandos específicos capturados para ligando_B está dada por $(A_{in} \times \alpha)/(B_{in} \times \beta)$. En la selección dos la proporción será $(A_{in} \times \alpha \times \alpha)/(B_{in} \times \beta \times \beta)$, y después de n selecciones la proporción será $(A_{in}/B_{in}) \times (\alpha/\beta)^n$.

Por tanto, al incrementarse las rondas de cernido, los antiligandos con especificidad para células objetivo únicas o ligando(s) sobreexpresados prevalecerán sobre antiligandos con especificidad a ligandos comúnmente expresados.

Sin embargo, múltiples rondas de cernido también disminuyen la frecuencia de antiligandos sobre las construcciones de ligando objetivo con especificidad para ligandos de célula objetivo única de baja expresión o enriquecidos (en comparación con antiligandos con especificidad para ligandos de célula objetivo única altamente expresados o enriquecidos) e.g. proporciones de antiligandos de las categorías E4 a R1 incrementan de 1:44 a 1:25 000 después de tres rondas de cernido cuando se utilizan 10^8 células objetivo y 10^9 células sustractivas (Figura 4). Esto prolonga el proceso de identificación para tales antiligandos y por tanto demuestra aún más la necesidad de utilización de concentraciones de ligando tan altas como sea posible en el proceso de selección.

Se llevan a cabo múltiples rondas de selección utilizando parámetros de reacción diferentes de la entrada antiligando (volumen, número de células objetivo y sustractivas) que se mantienen constantes (Figura 4).

Si se utilizan concentraciones de ligando lo suficientemente altas todos los antiligandos que posean, e.g. niveles nanomolares de afinidad de enlace se enlazarán a su ligando respectivo. Con parámetros de reacción como los utilizados en los ejemplos previos tomaría alrededor de 7×10^{15} ligandos para lograr esto.

Si la población menos abundante de ligando de interés está presente a tales niveles, y si la población de ligando sustractivo se añade en exceso en comparación con la población de ligando objetivo excediendo el número de antiligandos complejos en equilibrio (200 en este caso), serán aislados antiligandos específicos para ligandos que son más abundantes en la población original de células objetivo comparadas con la población de células sustractivas en números que incrementan en línea con el incremento en la población de células objetivo en comparación con la población sustractiva en una manera independiente de la abundancia de la población de ligando objetivo.

Antiligandos con especificidad para ligandos encontrados en números idénticos en poblaciones de ligando objetivo y sustractivo originales serán enlazados al ligando sustractivo (Tabla II/Figura 5).

TABLA II

Categorías molécula antiligando mediante prevalencia de población de antígeno positivo y población de antígeno negativo

Categoría antiligando	Especificidad antiligando	Abundancia población de antígeno positivo (moléculas x $3,5 \times 10^{-14}$)Tp	Abundancia población de antígeno negativo (moléculas x $3,5 \times 10^{-14}$)Ts
■	Antígeno positivo población restringida	1,00E+06	0,00E+00
A ■	Antígeno positivo población enriquecida	1,00E+06	1,00E+04
B ■	Antígeno positivo población enriquecida	1,00E+05	1,00E+03
C □	Antígeno positivo población enriquecida	1,00E+06	1,00E+05
D ■	Antígeno positivo población enriquecida	1,00E+05	1,00E+04
E ■	Antígeno positivo población enriquecida	5,00E+00	1,00E+00
□	Antígenos comúnmente abundantes (altamente abundantes) población positiva y negativa	1,00E+06	1,00E+06
■	Antígenos comúnmente abundantes (poco frecuentes) población positiva y negativa	1,00E+02	1,00E+02

Ejemplo 5

Realización preferente

En un aspecto preferente la presente invención se utiliza para aislar los antilíngandos con especificidad para antígenos de superficie celular en su configuración original e independiente de su naturaleza (proteína, carbohidrato, lípido, complejo). Adicionalmente los antígenos enlazados son aquellos sobreexpresados o expresados únicamente sobre un tipo de célula en comparación con otro (e.g. célula cancerosa transformada, célula infectada viral/microbiana/parasitaria/fungosa u otra célula estimulada mediante agonista o mediante infección versus células de control). (Figuras 2, 4 y 5).

Cuando se utiliza para selección de antilíngandos derivados de anticuerpo (e.g. antilíngandos codificadores scFV, Fab, o Fv), el método, simultáneamente con el proceso de identificación, genera anticuerpos terapéuticos candidatos que reaccionan con antígeno objetivo en su configuración original en la membrana celular.

Debido a que se necesitan grandes concentraciones de antígeno, el antígeno se utiliza en una forma que no deteriore la reacción de equilibrio. Por tanto, el antígeno se utiliza en formas que ocupen espacio mínimo e impongan poco aumento en viscosidad y fuerzas de corte.

Por ejemplo, cuando se busca antilíngandos a antígenos de superficie celular, puede utilizarse un proceso de bio-cernido de concurrencia que utiliza células objetivo enteras y exceso de membranas celulares sustractivas mezcladas con miembros de una biblioteca molecular antilíngando altamente diversificada, seguido de separación por densidad sobre un gradiente de albúmina de suero bovino Ficoll o Percoll y aislamiento selectivo de células objetivos y antilíngandos específicos para antígenos de células objetivo sobreexpresados y únicos.

En esta metodología la población de ligando objetivo (antígeno) está en la forma de células enteras (alta densidad) y el ligando sustractivo (antígeno) está en la forma de vesículas de membranas de plasma o células extraídas del núcleo (baja densidad).

Las poblaciones de antígeno objetivo y sustractivo están mezcladas con miembros de una biblioteca molecular altamente diversa en una forma controlada basada en las ecuaciones aquí descritas.

Por ejemplo, 5×10^7 células objetivo enteras se mezclan con vesículas de membrana celular de 1×10^{10} células sustractivas y mezcladas con miembros provenientes de una biblioteca altamente diversificada en un número de copia

de antiligando específico de 200 (que produce típicamente antiligandos de $K_d=10^{-8M}$ cuando se selecciona sobre antígeno puro) uno puede esperar aislar los antiligandos específicos para antígenos sobreexpresados 10 veces o más incluyendo aquellos expresados a densidades tan bajas como 10 000 por célula objetivo.

- 5 La reacción se incuba para alcanzar equilibrio. Después de un biocernido de concurrencia, los miembros de la biblioteca enlazados a la población objetivo se separan de los antiligandos no enlazados y de aquellos antiligandos no enlazados para controlar al antígeno sustractivo mediante separación de centrifugación por densidad, resultando en enriquecimiento de fagos específicos para antígenos altamente expresados presentes entre la población estudiada.
- 10 Donde la expresión del antígeno objetivo deseado sea superior en la población sustractiva el proceso se invierte, de manera que la población de ligando sustractivo se convierta en la población de ligando objetivo y viceversa.

Además de generar antiligandos con especificidad para ligandos diferencialmente expresados y únicos, el uso de diferentes medios de separación de densidad sobre un gradiente de densidad, ofrece diversas ventajas incluyendo:

- 15
 - Separación física y espacial de antiligandos complejos a ligando positivo de antiligandos no enlazados y antiligandos con especificidad para ligando encontrado en la población de control.
 - 20 ■ El lavado Ficoll aumenta la fuerza de corte. Por tanto, tal lavado es más eficiente y se necesitan menos repeticiones de lavado (rondas de cernido); y hay disociación mínima de antiligandos de interés enlazados específicamente (afinidad más elevada)
 - 25 ■ No requiere etiquetado o modificación química de células (compare FACS (clasificador celular activado por fluorescencia) o MACS (clasificador celular activado magnético) basado en biocernido de concurrencia) que pueda alternar la configuración/conformación y/o composición de la superficie celular del ligando.

Ejemplo 6

Todas las vesículas de membranas como medios de separación

- 30 Células enteras pueden ser reemplazadas por vesículas de membrana producidas en un medio de densidad superior, permitiendo concentraciones aún mayores de ligando a ser utilizadas sin comprometer la reacción de equilibrio.

Ejemplo 7

- 35 *Probando los efectos del estímulo en regulación ascendente/descendente de ligando*

- Una realización ulterior de la presente invención puede utilizarse para aislar los antiligandos con especificidad para ligandos celulares que se expresan a una densidad muy baja en solo un pequeño número de células dentro de la población celular bajo estudio.
- 40

Por ejemplo, un cierto estímulo puede sospecharse que dispare la sobreexpresión o subregulación de un antígeno de superficie celular presente en una subpoblación celular desconocida presente en sangre.

- 45 Células derivadas de sangre entera expuesta a este estímulo pueden mezclarse con membranas de plasma derivadas de sangre entera antes de la exposición al estímulo, y a una reacción competitiva de biocernido análoga a la antes descrita.

Ejemplo 8

- 50 *Uso diagnóstico del método de identificación*

- Un ejemplo ulterior de la presente invención, permite que antiligandos contra ligandos presentes en diferente abundancia en muestras biológicas (e.g. plasma, orina, líquido cerebroespinal) sean aislados a partir de bibliotecas moleculares altamente diversificadas. Tales antiligandos pueden subsecuentemente ser usados para por, e.g. análisis de expresión de proteína e identificación de marcadores biológicos potenciales.
- 55

- Si se utilizan concentraciones suficientemente altas de ligandos, el método de la presente invención permite el aislamiento selectivo de antiligandos contra ligandos sobreexpresados o únicos cuando se compara la composición de proteínas en dos muestras diferentes (Figura 2). Esto permite finalmente el aislamiento de antiligandos específicos para ligandos que son más abundantes en una población comparada con otra población, en una forma que es independiente de las concentraciones relativas de ligando dentro de la población de ligando positivo (Figura 5).
- 60

- Debido a las concentraciones extremas de ligando necesarias para alcanzar esto último, el ligando debe utilizarse preferiblemente en suspensión o solución. Por ejemplo, el ligando de la población objetivo puede dividirse y etiquetarse en diferentes posiciones para minimizar la destrucción y erradicación de ligandos relevantes, mientras que los ligandos de población sustractiva pueden utilizarse sin etiqueta y tratarse más superficialmente. El etiquetado de la población de ligando positivo brinda un medio para la recuperación subsiguiente de población de ligandos positivos y
- 65

enlazadores enlazados a población de ligandos positivos solo mediante el uso de ligandos etiquetados complejos con e.g. perlas magnéticas etiquetadas mediante contador.

Una aplicación de este método sería reunir y combinar muestras de plasma de una población de pacientes con cierta enfermedad y compararlas con una muestra de plasma de una población de control. En este caso las muestras de plasma del paciente se dividirían y etiquetarían, y la población de control quedaría no etiquetada (véase ejemplo 11).

Ejemplo 9

Prueba Experimental de la(s) ecuación(es)

Este ejemplo demuestra el uso experimental de la realización preferente - concurrencia de cernido mediante densidad utilizando células enteras y vesículas de membrana celular para aislar los antiligandos con especificidad para un ligando único de célula objetivo.

El fago modelo pKBitCD40L-2 es un fago específico CD40L y el fago modelo pBitBLTR-2 es un fago general de antiligando de fibroblasto de ratón (BioInvent, Suecia).

Para demostrar la substracción eficiente del fago con especificidad para antígenos comunes utilizamos el fago pBitBLTR-2. Este fago se aisló en un proceso previo de selección respecto a su capacidad general de enlazar células de fibroblastos 3T3 de ratón no transfectadas, transfectadas por CD32 y por CD40L.

La Figura 6 muestra el número de fagos portadores de resistencia a kanamicina (CD40L específicos) y fagos portadores de resistencia a ampicilina (enlazador de fibroblasto de ratón) que fueron eluidos a partir de células 3T3 transfectadas por CD40L (5×10^6), células 3T3 transfectadas por CD32 ($2,6 \times 10^6$), o células 3T3 no transfectadas (6×10^6) seguido de centrifugación basada en biocernido utilizando un caldo de fagos de $900 \mu\text{l}$ contentivo de 10^6 pfu de CD40L fago específico, 10^6 pfu fago enlazador general de fibroblasto de ratón y 10^{10} pfu de fago de ayuda R408 (no resistencia antibiótica).

La afinidad del fago CD40L específico scFv se demostró previamente que era $K_d = 8 \times 10^{-9} \text{M}$. La expresión de CD40L y CD32 de fibroblasto de ratón se confirmó manchando con anticuerpos monoclonales (MAb) y por análisis de flujo citométrico (no se muestra).

La especificidad antiligando de CD40L del fago resistente a la kanamicina se confirmó mediante recuperación selectiva de estos fagos a partir de fibroblastos de ratón transfectados con CD40L. La especificidad general de fibroblasto de ratón del fago portador de resistencia a la ampicilina se confirmó mediante recuperación de números similares de fagos portadores de resistencia a la ampicilina siguiendo elución de fibroblastos de ratón transfectados por CD40L, transfectados por CD32 y no transfectados (Figura 7).

La eficacia de la utilización de membrana en exceso como sustractivos de fago con especificidad irrelevante fue demostrada comparando la proporción de fagos resistentes a kanamicina y a ampicilina eluidos a partir de:

- 1) un proceso de selección con células transfectadas por CD40L solamente,
- 2) un proceso de preselección utilizando fibroblastos enteros de ratón transfectados por CD32 en exceso de cuatro veces; y
- 3) un biocernido de concurrencia utilizando un exceso en 50 veces de membranas de plasma transfectadas por CD32.

La concurrencia de membrana de plasma fue cinco veces más eficiente que la preselección utilizando células enteras; y la utilización de membranas resultó en una reacción de selección menos viscosa en comparación con el caso de utilización de células enteras.

Métodos experimentales

Producción de Fagos

Se utilizó una biblioteca de anticuerpos de fragmentos scFv humanos para aislar fragmentos de anticuerpo reconocedores del antígeno ligando CD40 (CD40L) sobre células 3T3 de ratón transfectadas por CD40L.

En la primera ronda de preselección se incubó la biblioteca (7×10^{13} CFU/ml, 1,8 ml) con $9,3 \times 10^6$ células no transfectadas 3T3 de fibroblasto de ratón (1 ml) y 0,2 ml de medio R10 (RPMI 1640, 10% FCS, 1x aminoácidos no esenciales, 2 mM EDTA, 50 mM HEPES, (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, 20877, USA) durante 75 min. a 15°C con rotación lenta y un volumen total de reacción de 4,0 ml.

ES 2 314 280 T3

Las células se centrifugaron durante 10 min. a 1 500 r.p.m., 15°C y el material flotante contenido del fago se transfirió a un segundo paso de preselección análogo al primero, excepto en que se utilizaron fibroblastos de ratón transfectados por CD₃₂ (1×10^7).

- 5 Siguiendo a la preselección, los fagos se precipitaron mediante tratamiento con glicol de polietileno (PEG), se resuspendieron en 1 ml de medio R10 y se utilizaron para selección positiva sobre 1×10^7 células 3T3 transfectadas por CD40L. La selección positiva se llevó a cabo a 20°C, durante 3 horas de rotación lenta.

- 10 Las células se lavaron dos veces en gradientes de densidad consistentes en 40% de Ficoll/2% BSA/PBS (Gibco BRL) de Dulbecco y una vez en PBS de Dulbecco solamente.

Los fagos enlazados se eluyeron de las células mediante resuspensión en 1 ml de Glicina/HCL pH 2,2, a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido de neutralización en 2M Tris-HCl (pH 7,4).

- 15 Luego de la centrifugación y recolección de la fase eluída, el remanente de fagos enlazados se levigó en 1 ml de solución de tripsina EDTA x 0,4 (Gibco BRL) en medio R10. La preselección y selección positiva se repitió tres veces al igual que lo anterior.

- 20 La especificidad del fago ScFv seleccionado se determinó mediante, primero, identificación de clones de fagos individuales para reactividad contra fibroblastos de ratón 3T3 transfectados por CD32 o CD40L en ELISA celular. Alrededor de un 20% de estos clones mostró reactividad selectiva con células transfectadas por CD40L y fueron recogidos para un análisis posterior.

- 25 Los clones seleccionados se convirtieron a formato scFv por escisión del fragmento de gen III y se produjeron moléculas scFv en la cepa no supresora *E. coli* HB101. La especificidad de los clones se confirmó mediante ELISA de célula scFv entera y citometría en flujo, utilizando células de fibroblasto de ratón 3T3 no transfectadas, y transfectadas por CD32 y por CD40L.

- 30 Para el análisis de flujo citométrico se detectó enlace scFv mediante anticuerpo antimarcado M2 biotinilado (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) y adición subsiguiente de Streptavidina PE (DAKO, Glostrup, Denmark). La afinidad del clon 7E para el antígeno CD40L fue $K_d = 8 \times 10^{-9} M$ determinada por mancha de raspado profundo utilizando células enteras 3T3 transfectadas por CD40L y una fuente antigénica (datos no publicados).

- 35 La selección del fago general de ratón pBitBLTR-2 se llevó a cabo esencialmente al igual que la del pKBitCD40L-2, excepto que se utilizaron células 3T3 transfectadas por BLTR para la selección positiva. El clon BLTR-2 fue seleccionado como un clon que mostraba igual enlace a células 3T3 no transfectadas, que a células transfectadas por CD32 y CD40L, determinado mediante citometría en flujo al nivel de ScFv.

40 *Biocernido concurrente*

Caldo de fagos

- 45 10^6 cfu de fago específico CD40L (Kan^r)
 10^6 cfu de fago enlazador general de fibroblastos de ratón (Amp^r)
 10^{10} cfu de fago de ayuda R408 (no resistencia antibiótica)

50 *Células - Positivas (Construcción de segundo ligando objetivo)*

- A1. 5×10^6 células de fibroblastos 3T3 de ratón transfectados por CD40L.
55 C1. 5×10^6 fibroblastos 3T3 transfectados por CD40L solamente.
C2. $2,5 \times 10^6$ fibroblastos 3T3 transfectados por CD₃₂ solamente (limitado).
C3. 5×10^6 células de fibroblastos 3T3 de ratón no transfectadas solamente.

60

Células - Negativas (Construcción de primer ligando sustractivo)

- A1. Membranas 3T3 de ratón transfectadas por CD32 equivalentes a $2,5 \times 10^9$ células.

65

ES 2 314 280 T3

Método

1. Un caldo de 1 ml de fagos se precalentó a 37°C durante 15 min. (se preparó un caldo de fagos de 4 ml diluyendo CD40L fago específico y fago antiligando de célula general 3T3 de ratón BLTR a 10^6 cfu/ml y R408 fago de ayuda a 10^{10} cfu/ml en 2% PBS de leche. Este caldo de fagos se dividió en 4x1 ml, transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se utilizó para realizar selecciones concurrentes A y B y preselección/selecciones convencionales A y B). El caldo de fagos se llevó a efecto de vórtice intermitentemente y centrifugó durante 15 minutos a máxima velocidad en una centrífuga Eppendorf. Donde se formó un precipitado, el material flotante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. Se añadió leche descremada a una concentración del 2%.
2. Se descongelaron preparados sencillos de membranas de plasma de células 3T3 de fibroblasto de ratón transfectadas por CD32 a partir de 5×10^8 células en hielo. Se guardaron 10 μ l para determinación de concentración de proteína. El caldo de fagos se resuspendió y mezcló con una pipeta. El caldo se incubó entonces durante 5 min. sobre hielo.
3. 5×10^6 células 3T3 transfectadas por CD40L o no transfectadas se centrifugaron a 1 300 r.p.m durante 6 min. a 4°C.
4. El material flotante se desechó y las células 3T3 transfectadas con CD40L o no transfectadas se resuspendieron en la solución láctea del caldo de fagos negativos de membrana celular (paso 2) y se incubaron a 10°C mientras sufrían una lenta rotación (extremo sobre extremo) durante 4 horas.
5. El incubado de célula/membrana de células/fago membrana/membrana se transfirió a tubo Falcon de 15 ml contentivo de 10 ml de Ficoll-Plaque Plus al 40% y 2% de BSA en PBS (con Ca y Mg) y centrifugada a 1 500 r.p.m durante 10 min. a 4°C.
6. El material flotante se retiró cuidadosamente aspirando primero el material flotante de la capa superior (guardando el separado de la fracción de membrana (100 μ l) para subsiguiente dosificación), y entonces se trabajó secuencialmente de manera descendente hacia las bolitas celulares contentivas de las partículas del fago objetivo enlazado. Se retiró tanto material flotante como fuera posible (guardando 25 μ l de material flotante para dosificación) y la bolita celular fue resuspendida en 500 μ l de BSA de PBS al 2%. El lavado realizado en (paso 5) se repite una vez (guardando el material flotante para dosificación).
7. Las células se resuspenden en 1 ml de PBS, transferidas a un nuevo tubo Eppendorf de 15 ml y centrifugadas a 1 260 r.p.m durante 10 min. a 4°C. El material flotante se retira utilizando una pipeta (guardando el material flotante para dosificación).
8. Los fagos se eluyeron de las células mediante adición de 150 μ l de 76 mM de ácido cítrico (pH 2,5) en PBS seguido de incubación a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se neutraliza añadiendo 200 μ l de 1M Tris-HCl, H 7,4. La centrifugación se repite y se guarda el fago eluido.
9. Las células se resuspenden en 1 ml de tripsina, transfieren a un nuevo tubo e incuban durante 10 min. Entonces se inactivan con 1 mg/ml de 40 μ l de aprotinina y centrifugan, guardando el material flotante para dosificación. La bolita bacteriana se guarda para infección de bacteria.

Preselección de biocernido

Caldo de fagos

- 10⁶ cfu de fago específico CD40L (Kan^r)
- 10⁶ cfu de fago enlazador general de fibroblasto de ratón (Amp^r)
- 10¹⁰ cfu de fago de ayuda R408 (no resistencia antibiótica)

Células positivas (Objetivo) - 5×10^6 células 3T3 de fibroblastos de ratón transfectadas por CD40L

Células negativas (Sustractivas) - 2×10^7 células de fibroblastos de ratón transfectadas por CD32

Método

1. Un caldo de fagos de 1 ml se precalentó a 37°C durante 15 min. y se llevó a efecto de vórtice intermitentemente. El caldo de fagos se centrifugó durante 15 min. a máxima velocidad en centrífuga Eppendorf. Donde se formó precipitado, el material flotante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se añadió leche descremada a una concentración del 2%.

ES 2 314 280 T3

2. Se centrifugaron 2×10^7 células 3T3 no transfectadas a 1 300 r.p.m, 6 min., 4°C. El material flotante se descartó y las células se resuspendieron por adición de caldo de fagos y mezclados con una pipeta de 1 ml. Esto entonces se incubó a 10°C a rotación lenta (extremo sobre extremo) durante 4 horas. Entonces las células se centrifugaron a 1 300 r.p.m durante 6 min. a 4°C y el material flotante se transfirió a un nuevo tubo. Se guardaron 20 μ l de material flotante para dosificación de fagos.
3. 5×10^6 células 3T3 transfectadas por CD40L se separaron, lavaron y centrifugaron a 1 300 r.p.m durante 6 min. a 4°C.
4. El material flotante se desechó y las células 3T3 transfectadas por CD40L se resuspendieron en la solución láctea de caldo de fagos (paso 2). Esta se incubó entonces a 10°C a rotación lenta (extremo sobre extremo) durante 4 horas.
5. La célula/fago incubado se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml contentivo de 10 ml de Ficoll-Paque Plus al 40% y BSA en PBS al 2% (con Ca y Mg) y entonces se centrifugó a 1 500 r.p.m durante 10 min. a 4°C.
6. El material flotante se retiró cuidadosamente por aspiración del material flotante de la capa superior primero entonces se trabajó mediante retiro secuencial descendente hasta la bolita celular contentiva de las partículas enlazadas de fago objetivo. Se retiró tanto material flotante como fue posible (y se guardó) y la bolita celular resuspendida en 500 μ l de PBS al 2% de BSA. El lavado tal como el realizado en (paso 5) se repitió una vez (y se guardó para dosificación).
7. Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf de 15 ml. Entonces se centrifugaron a 1 260 r.p.m durante 10 min. a 4°C. El material flotante se retiró utilizando una pipeta (y se guardó para dosificación).
8. Los fagos se eluyeron de las células añadiendo 150 μ l de 76 mM de ácido cítrico (pH 2,5) en PBS seguido de incubación a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se neutralizó añadiendo 200 μ l de 1 M Tris-HCl, pH 7,4 y entonces se centrifugó y se guardó el fago eluido.
9. Las células se resuspendieron en 1 ml de tripsina, transfirieron a un nuevo tubo e incubaron durante 10 min. Se inactivaron entonces con 1 mg/ml de 40 μ l de aprotinina. Las células se centrifugaron y el material flotante y bolitas se guardaron para infección de bacteria.

Procedimiento para amplificación de fagos a partir de bacteria (10 ml)

1. Cada expresión se infecta con 10 ml de LB (100 μ g/ml ampicilina, 15 μ g/ml tetraciclina con 5 μ l de los caldos de glicerol).
2. Se cultivaron a 37°C y 175 r.p.m hasta $OD_{600}=0,5$ y 6×10^9 PFU de fago de ayuda R408 por ml de cultivo añadido e incubado durante 30 minutos a 37°C y 50 r.p.m.
3. Se añadió solución IPTG a una concentración final de 10 μ M se incubó durante la noche a 25°C y 175 r.p.m.
4. Al siguiente día se cosecharon los fagos (como abajo).

Cultivo y precipitación de PEG de caldos amplificados de fagos

1. Las bacterias se llevaron a bolitas por centrifugación durante 10 min. a 2 100 g/(3 000 rpm, en Beckman GS-6) a temperatura ambiente.
2. El material flotante se filtró de forma estéril a través de filtro estéril de 0,2 μ m. Cualquier material flotante surgido de la misma selección se recombinó.
3. Los fagos se precipitaron añadiendo $\frac{1}{4}$ de volumen de búfer de precipitado de fago (20% PEG 6000, 2,5 M NaCl) y se incubaron durante al menos 4 horas a 4°C (aunque esto puede dejarse incubando durante semanas).
4. La preparación se centrifugó entonces durante 30 min. a 4°C y 13 000 g.
5. La bolita se resuspendió completamente en 500 μ l de PBS, (incubación a 37°C con agitación durante 1 hora) y entonces se almacenó a 4°C durante la noche.

Dosificación de combinaciones de fagos

1. El caldo de fagos se diluyó en PBS estéril. (Diluciones apropiadas para caldo eluido 10 x, 10^2 x, 10^3 x, 10^4 x, y para caldo inicial o amplificado 10^6 x 10^7 x, 10^8 x, 10^9 x).

ES 2 314 280 T3

2. 100 μ l de bacteria indicadora (cultivada a $OD_{600}=0,5$) se mezclaron con 10 μ l de cada dilución de fago e incubaron durante 30 minutos a 37°C y 50 r.p.m.

3. Se colocaron entonces en placas agar LB (100 μ g/ml ampicilina, 15 μ g/ml tetraciclina, 1% glucosa) y se incubaron durante la noche a 37°C.

4. Las colonias se contaron entonces y se calculó la dosificación (CFU/ml), (CFU x dilución x 100).

10 *Preparación de membranas de plasma a partir de células 3T3 transfectadas por CD32*

1. Las células se cultivaron a confluencia en grandes placas (500 cm²). Las células (1×10^9) se lavaron una vez con verseno (50 ml BS sin calcio y magnesio conteniendo 2 mM EDTA) y se incubaron entonces con un pequeño volumen de verseno (cubriendo ligeramente la malla celular) a 37°C en un incubador celular.

2. Las células se liberaron golpeando la probeta contra la palma de una mano y entonces se resuspendieron en PBS (con Ca y Mg), centrifugaron en tubos de 50 ml durante 7 min. a 1 200 r.p.m a 4°C, y lavaron de nuevo en PBS (con Ca y Mg).

3. Las células se lavaron una vez, resuspendieron en aproximadamente 14 ml de 0,145 M NaCl y transfirieron a un tubo de ensayo de 15 ml. Entonces se centrifugaron durante 7 min. a 1 200 r.p.m, aspiraron y resuspendieron en 14 ml de 0,145 M NaCl. La centrifugación posterior durante 7 min. a 1 200 r.p.m se llevó a cabo y se retiró el material flotante y las pellas celulares se congelaron a -80°C.

4. La bolita se resuspendió mediante efecto de vórtice en 8 ml (no transfectados) de 4 ml (células CD32) de Búfer A congelado (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,25 M sacarosa, pH 7,0) mezclados frescos con PMSF (fluoruro de fenilmetil-sulfonilo) a una concentración final de 1 mM.

5. La suspensión celular se homogenizó con 20 golpes de un homogenizador Dounce (tipo B, preenfriado) y el homogeneizado centrifugado en centrifuga Eppendorf durante 10 min. a 6 000 r.p.m a 4°C.

6. El material flotante se recolectó con pipeta Pasteur y la bolita se resuspendió en 4 ml (no transfectados) o 2 ml (células CD32) de Búfer A & PMSF, entonces se homogenizó y centrifugó como en el caso anterior. El material flotante se combinó y se descartó la bolita.

7. El material flotante se cubrió en capas utilizando una pipeta Pasteur, sobre 0,5 ml de Buffer Cushion (Búfer C contentivo de 37% de solución final de sacarosa) y centrifugó durante 60 min. a 4°C utilizando rotor SW 60,1 (preenfriado) a 30 000 r.p.m (100 000 x g). Se equilibraron cuidadosamente para este paso de centrifugación (a <0.0005 g de diferencia entre muestras pareadas).

8. La capa de membrana (opalescente) se recolectó en la interfase de amortiguamiento, donde se trató de asimilar todo el material en una pequeña cantidad de líquido. El material recolectado se diluyó entonces con 4 vol. de Búfer C frío (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,0) y centrifugó a 30 000 g (rotor JA 25-50, 20 000 r.p.m) durante 30 min. a 4°C. La bolita resultante se resuspendió mediante efecto de vórtice en 150 μ l de Búfer C frío. La mezcla resuspendida se congeló y almacenó a -80°C.

9. La concentración de proteína en membrana se determinó mediante kit de BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) a 60 mg/ml.

50 Ejemplo 10

Prueba experimental ulterior de la(s) ecuación(es)

Este ejemplo demuestra un uso experimental ulterior de como la presente invención puede utilizarse para aislar, a partir de una biblioteca altamente diversificada de fagos scFv, a enlazadores que son específicos para antígenos celulares de superficie distribuidos de manera única en una población celular.

La proporción de impacto del enlazador luego de tres rondas de selección concurrente utilizando la presente invención se muestra en comparación con la de una preselección convencional negativa con una selección subsiguiente positiva-negativa (i.e. tres rondas de selección).

Los linfocitos B expresan un número de antígenos celulares de superficie que no se encuentran normalmente en linfocitos T. Tales antígenos incluyen el receptor de inmunoglobulina de célula B y sus correceptores (CD19, CD21), el canal iónico de expansión de 4 transmembranas CD20 y el receptor Fc γ CD32.

Las células B, sin embargo, expresan antígenos celulares de superficie que también se encuentran en común con linfocitos T, incluyendo receptores de integrina e.g. LFA-1 (CD11a/CD18), VLA-2, y VLA-4, ICAM-1, receptores desactivadores de complemento e.g. DAF y Proctectina, y receptores de citoquina como IFN- γ R y TNFR. Por tanto,

ES 2 314 280 T3

las células B y T brindan un sistema de modelo atractivo para probar la aplicabilidad de biocernido concurrente desde una biblioteca de exposición de fagos scFv.

En este experimento se mezclan 2×10^{13} partículas de fagos de la biblioteca n-CoDeR altamente diversificada que comprende 10^{10} enlazadores de genotipo único con células Ramos enteras de la línea celular de linfoma B (selección positiva), y membrana de plasma o vesículas vírgenes de membranas de la línea celular Jurkat de leucemia T. (selección negativa). Los enlazadores específicos para antígenos que se expresan únicamente sobre la línea celular Ramos del linfoma B, comparados con los de la línea celular Jurkat de la célula T de leucemia, deberán ser aislados selectivamente.

Cálculo del número celular positivo y negativo para selección

Los números celulares a utilizar en las diferentes rondas de selección se calcularon utilizando la ecuación VI. Los parámetros de reacción utilizados para los cálculos fueron como se muestra en la Tabla III (IIIA & IIIB).

TABLA III

IIIA

Selección de concurrencia		Expresión de antígeno (antígenos/célula)	
Especificidad de fagémido		Expresión de célula positiva	Expresión de célula sustractiva
+Célula (célula B) Antígeno restringido		1,00E+05	0,00E+00
+Célula (célula B) Antígeno reforzado		1,00E+05	1,00E+03
+Célula (célula B) Antígeno reforzado		1,00E+05	1,00E+04
+Célula (célula B) Antígeno reforzado		5,00E+04	1,00E+03
+Célula (célula B) Antígeno reforzado		5,00E+04	1,00E+04
+Célula (célula B) Antígeno reforzado		1,00E+04	1,00E+03
(célula B/célula T) Antígeno expresado común (altamente expresado)		1,00E+06	1,00E+06
(célula B/célula T) Antígeno expresado común (altamente expresado)		1,00E+05	1,00E+05
- célula (célula T) Antígeno restringido		0	1,00E+05
No unido		0	0
AF (R1-R2)		1,50E+03	
AF (R1-R2)		6,00E+04	
Kd		1,00E-08	
Constante de Avogadro		6,02E+23	
Entrada R1 de fago de genotipo específico		2,00E+02	
Volumen de reacción V(L) R1		2,00E-03	
Volumen de reacción V(L) R2		5,00E-04	
Volumen de reacción V(L) R3		5,00E-04	
	Número de + Células (células B) usadas en las rondas de selección	Equivalentes de + Células (vesículas de membranas de Células T)	
R1	5,00E+07	2,00E+09	
R2	5,00E+06	1,00E+09	
R3	5,00E+06	1,00E+09	

IIIB

Partículas de fagos recuperadas en célula positiva		
R1		
Entrada fago	Recuperado*	Frecuencia relativa
2,00E+02	59	0,296
2,00E+02	53	0,264
2,00E+02	27	0,133
2,00E+02	30	0,152
2,00E+02	14	0,073
2,00E+02	7	0,035
2,00E+02	5	0,024
2,00E+02	5	0,023
2,00E+02	0	0,000
2,00E+02	0	0,000
R2		
Entrada fago	Recuperado*	Frecuencia relativa
9,E+04	1,3E+04	0,482
8,E+04	8,7E+03	0,336
4,E+04	1,5E+03	0,953
5,E+04	2,7E+03	0,102
2,E+04	4,1E+02	0,016
1,E+04	1,3E+02	0,005
7,E+04	3,6E+01	0,001
7,E+03	3,3E+01	0,001
0,E+00	0,0E+01	0,000
0,E+00	0,0E+00	0,000
R3		
Entrada fago	Recuperado*	Frecuencia relativa
8,E+08	1,1E+08	0,60022
5,E+08	5,8E+07	0,32542
9,E+07	3,3E+06	0,01855
2,E+08	9,4E+04	0,05248
2,E+07	4,6E+05	0,00259
8,6+06	9,4E+04	0,00053
2,6+06	1,1E+04	0,00006
2,E+06	9,7E+03	0,00005
0,0E+00	0,0E+00	0,00000
0,E+00	0,0E+00	0,00000

Tabla III. Selección de parámetros de reacción utilizados en el biocernido concurrente de célula entera (Ramos)/ vesícula de membrana (Jurkat). Kd=afinidad más baja relevante de antilgandos específicos de ligando objetivo a ser aislados, entrada R1 de genotipo fago específico=antilgando (número de copia fago scFv de comienzo de biblioteca antilgando), AF= factor de amplificación utilizado para calcular entrada de fago en rondas de selección R2 y R3 siguiendo elución y amplificación de fagos de las rondas R1 y R2 respectivamente. Frecuencia relativa: la frecuencia esperada de antilgandos aislados con especificidad para antígenos que pertenecen a una categoría de antígeno comparada con todos los antilgandos aislados.

Se eligieron números de células positivas y negativas de manera que, siguiendo tres rondas de selección, enlazadores con especificidad para antígenos expresados únicamente sobre células B serán enriquecidos 10 000 veces sobre un antígeno expresado a igual densidad sobre células B y T.

El número de entrada de enlazadores de fagos específicos para diferentes categorías de antígeno (enriquecidos célula positiva, únicos célula positiva, o antígeno comúnmente expresado célula positiva/negativa) en las rondas de

ES 2 314 280 T3

selección 2 y 3 se calculó multiplicando el número calculado del fago eluido, específico para diferentes categorías del antígeno que sigue a las rondas de selección 1 y 2, con el factor de amplificación (AF).

5 El factor de amplificación se obtuvo dividiendo el número total de fagos amplificados luego de ronda de selección relevante entre el número total de fagos eluidos de la misma ronda de selección.

10 Las figuras 8A y 8B muestran la comparación de biocernido mediante el presente método y mediante métodos previamente conocidos sobre célula B (Ramos) versus clones scFv de célula T (Jurkat). La reactividad de célula B y especificidad de SCFVs aislados utilizando la presente invención queda extraordinariamente mejorada en comparación con la de ScFv seleccionada mediante biocernido de convencional.

Métodos experimentales

15 *Cultivo de células*

La línea de células Jurkat T, clon E6-1 y la línea de células de linfoma B Ramos, se obtuvieron de ATCC y cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% FCS (inactivado mediante calor para células Ramos únicamente), 10 mM HEPES y 1 mM de piruvato de sodio en una atmósfera humidificada a 37°C. Las células se mantuvieron a 1-2x10⁶ células/ml (<1 x10⁶ células/ml para Jurkat).

Preparación de membrana de plasma de célula Jurkat T

25 *Cultivo de células Jurkat*

Se mantuvieron células Jurkat E6-1 en RPMI-1640 con Glutamax I (Gibco, No 61870-010) suplementadas con 10% de suero fetal de becerro (Gibco, Lote no. 1128016), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco) y 10 mM búfer Hepes (Gibco) en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C, y a densidades celulares entre 1x10⁵ a 1x10⁶ células/ml. En el paso final, se le permitió a las células alcanzar una densidad máxima de 2x10⁶, en cuyo punto fueron cosechadas.

30 *Disrupción celular*

1. Las células se cultivaron a partir de cultivo mediante centrifugación en tubos de centrífuga de 500 ml (Corning, No 431123) colocados en adaptadores de tubo, 1 500 r.p.m, 15 min. a 4°C.

35 2. El material flotante se descartó y lavó en 0,145M NaCl. Las suspensiones se combinaron, se contaron las células (total de 5x10⁹ células), y se repitió la centrifugación.

40 3. La disrupción celular se llevó a cabo mediante shock hipo osmótico en 1 mM NaHCO₃ 31,5 mM MgAc pH 7,4 sobre hielo durante 10-30 min. y subsecuentemente ocurrió cavitación de nitrógeno en una prensa Yeda, 40 bar. (4 000 kPa) durante 15 min. a 0°C. La concentración celular no excedió 5x10⁷ células/ml.

4. Luego de la disrupción 150 µl 0,5M EDTA se añadieron a la suspensión de homogeneizado para arrojar una concentración final EDTA de 1 mM (adición de EDTA evita agregación de vesículas de membranas).

45 5. A) Aislamiento membrana cruda: El homogeneizado (50 ml) se centrifugó durante 10 min a 1 900 g (4 000 r.p.m en un rotor SS34) para retirar células intactas y núcleos, y se recolectó el material flotante. Se evitó el lavado y recentrifugación de pellas ya que los núcleos frágiles tienden a romperse, causando filtración de ADN y agregación; o

50 B) Aislamiento membrana de plasma: 10 ml de 37,2% sacarosa se colocaron en el fondo de un tubo Beckman de ultracentrifugación de 6x38,5 ml, y 6x27 ml del homogeneizado celular del paso 2 anterior se le colocaron encima cuidadosamente. El tubo se centrifugó a 27 000 rpm en un rotor giratorio SW28 (6x39 ml de capacidad nominal) durante 2 h 45 min. a 4°C. Las membranas de plasma se aislaron de los tubos al combinar la banda blanca de la interfase entre el colchón de sacarosa y la fase de muestra, y éstas se dividieron entre tubos de 4x35 ml y diluyeron en búfer TE (1 mM Tris/0,25M sacarosa/0,25M búfer EDTA) a un volumen total de 35 ml.

55 6. La ultracentrifugación fue en un rotor Beckman Tipo 45Ti (tubos Nalgene de capacidad nominal 6x94 ml) a 40 000 rpm (aproximadamente 200 000xg) durante 1 hora a 4°C.

60 7. El material flotante se desechó y cualquier búfer remanente se retiró utilizando una *Finnpipeta* de 1 ml. Las pellas de membranas de plasma se rasparon del fondo de los tubos con una barra metálica y transfirieron a un pequeño homogenizador Dounce. Las membranas en forma de pellas se resuspendieron mediante homogenización en un volumen total de 2,5 ml de búfer de TE contentivo de 10 mM Hepes (10 mM Hepes/1 mM Tris/0,25M sacarosa/0,25M búfer de EDTA) con 5-10 golpes con un pistón poco ajustado Dounce de vidrio. Aproximadamente, las membranas derivadas de 2x10⁹ células Jurkat pueden resuspenderse por ml de búfer (TE) de resuspensión.

ES 2 314 280 T3

Determinación de concentración de proteínas

La determinación de concentración de proteínas se llevó a cabo utilizando el kit BCA según instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó un estándar BSA doble mediante diluciones en dos veces (muestra de 10 μ l + búfer 5 10 μ l) en PBS de una solución de caldo BSA de 2 mg/ml. Se generó una curva estándar y se utilizó para determinar la concentración total de proteína de las muestras de membrana.

Actividad membrana de plasma (mediante ensayo de fosfatasa alcalina)

Soluciones de fosfatasa alcalina

Solución de sustrato:

Una tableta p-N PP por 10 ml de búfer de borato (1,5 mg/ml concentración final) en 50 mM de búfer de borato de sodio (pH 9,8), 1,0 mM $MgCl_2$.

Se diluyeron muestras triplicadas en búfer de borato/ $MgCl_2$ transfiriendo muestra de 50 μ l a búfer de dilución de 50 μ l (50 mM de búfer de borato de sodio (pH 9,8), 1,0 mM $MgCl_2$). Se añadieron 200 μ l de solución de sustrato 20 (1 tableta p-NPP por 10 ml de búfer de borato a 1,5 mg/ml de concentración final en 50 mM de búfer de borato de sodio, pH 9,8, 1,0 mM $MgCl_2$) a dos o tres muestras para cada dilución. Las muestras se incubaron entonces a 37°C por más de 60 minutos. La absorbencia del material flotante se midió a 410 nm, y los valores de los pocillos de control apropiados (e.g. homogeneizado total de células cavitadas por nitrógeno, excluidos núcleos y mitocondria pesada) donde el sustrato no se añadió, fueron sustraídos. Los resultados se graficaron y analizaron.

Procedimiento de selección: Protocolo de biocernido concurrente

Parámetros de reacción

1ª ronda de selección

Caldo de fagos n-CoDeR Lib2000 comprendiendo 10^{10} partículas de fagémido de genotipo único (Ampr) amplificadas a 2×10^{13} pfu total en 1,6 ml 2% PBS lácteo (con Ca y Mg).

Volumen total de reacción: 2,5 ml.

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

Negativo - Membranas vírgenes de células Jurkat T derivadas de 2×10^9 células

2ª ronda de selección

$1,5 \times 10^{12}$ fagos eluidos a partir de ronda previa de selección y entonces amplificados, precipitados y resuspendidos en 100 μ l al 2% de PBS lácteo (con Ca y Mg).

Volumen total de reacción: 0,5 ml.

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

Negativo - Vesículas de membranas vírgenes de células Jurkat T derivadas de 1×10^9 células.

3ª ronda de selección

1×10^{12} fagos eluidos y amplificados a partir de ronda previa de selección resuspendido en 100 μ l 2% de PBS lácteo (con Ca y Mg).

Volumen total de reacción: 0,5 ml.

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

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

ES 2 314 280 T3

Método

Un caldo de 2 ml de fagos fue precalentado a 37°C durante 15 min. y sometido a efecto de vórtice intermitente. El caldo de fagos fue centrifugado durante 15 min. a máxima velocidad en una centrifuga Eppendorf. Donde se formó un precipitado, el material flotante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y resuspendió en leche desgrasada a una concentración final del 2%.

Preparados descongelados de membranas de plasma de célula de control Jurkat de 2×10^9 células sobre hielo (biocernido rondas 2 y 3 1×10^9 células). (También se guardaron 10 μ l para determinación de concentración de proteína). Los preparados descongelados de membrana de plasma se resuspendieron añadiendo caldo de fagos mezclando con una pipeta e incubado subsecuentemente durante 15 minutos sobre hielo. Se centrifugaron 5×10^8 células Ramos a 1.200 r.p.m, 6 min., 4°C (biocernido rondas 2 y 3 5×10^6 células).

El material flotante se desechó y las células Ramos se resuspendieron en la solución de caldo de membrana celular láctea-fago-negativa de la ronda de biocernido 2 y se incubó a 10°C y sujetó a rotación lenta (extremo sobre extremo) durante 4 horas.

El incubado de células/células membrana/fago se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml contentivo de 1 ml al 100% (mancha trypan azul) Ficoll en el fondo, y capa de 9 ml al 40% de Ficoll-Paque Plus en 2% BSA/PBS (con Ca y Mg). Centrifugado a 1 500 r.p.m durante 10 min., 4°C. El tubo se rotó 180° y centrifugó durante un minuto más para desprender células de la pared del tubo.

La interfase contentiva de células Ramos enteras y el fago enlazado se aspiraron cuidadosamente utilizando una jeringa y una aguja de calibre superior (e.g. Microlance 3 - 19GA11/21, 1x40 TW PM). La aguja se insertó justo debajo de la interfase contentiva de célula con el extremo biselado de la aguja hacia arriba. La capa celular se recolectó (aproximadamente 150 μ l) y la aguja se empujó a través del plástico del tubo opuesto al orificio de entrada. Los contenidos de la jeringa se expulsaron a un tubo fresco, y se lavaron dos veces absorbiendo PBS fresco dentro de la aguja (todavía colocada penetrando el tubo). La suspensión celular cosechada se resuspendió en 500 μ l de PBS-BSA al 2% y se repitió el lavado, guardando el material flotante para dosificación.

Se resuspendieron las células en 1 ml de PBS y transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf de 15 ml en el cual se centrifugaron a 1 260 r.p.m durante 10 min., 4°C. El material flotante se retiró utilizando una pipeta, guardando el material flotante para dosificación.

Los fagos se eluyeron de la células añadiendo 150 μ l de 76 mM de ácido cítrico (pH 2,5) en PBS seguido de incubación a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se neutralizó añadiendo 200 μ l de 1 M Tris H-Cl, pH 7,4. Las células se centrifugaron entonces y se guardó el fago eluido.

Las células se resuspendieron en 1 ml de tripsina y transfirieron a un nuevo tubo e incubaron durante 10 min. antes de desactivación con 40 μ l 1 mg/ml de aprotinina. Las células se centrifugaron, guardando el material flotante para dosificación.

Protocolo de control de selección

El control de selección se llevó a cabo utilizando preselección convencional negativa y subsiguiente selección positiva utilizando concentraciones de células.

Parámetros de reacción

Células

En todas las rondas de selección

Volumen total de reacción 4 ml

Preselección negativa - 1×10^8 células de célula Jurkat T

Positiva - 2×10^7 células de linfoma de célula Ramos B

1ª ronda de selección

Caldo de fagos n-CoDeR Lib2000 comprendiendo 10^{10} partículas fagémidas de genotipo único (Ampr) amplificadas a 2×10^{12} pfu total en 2,5 ml al 2% de PBS lácteo (con Ca y Mg).

ES 2 314 280 T3

2ª ronda de selección

2,6x10¹⁰ fagos eluidos a partir de la ronda de selección previa y entonces amplificados, precipitados y resuspendidos en 2,5 ml al 2% de PBS lácteo (con Ca y Mg)

3ª ronda de selección

5,4x10¹⁰ fagos eluidos y amplificados a partir de la ronda de selección previa resuspendidos en 2,5 ml al 2% de Pbs lácteo (con Ca y Mg).

Método

Un caldo de 2,5 ml de fago se precalentó a 37°C durante 15 min. y se llevó a efecto de vórtice intermitentemente. El caldo de fagos se centrifugó durante 15 min a máxima velocidad en una centrífuga Eppendorf. Donde se formara precipitado, el material flotante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y subsecuentemente resuspendió en leche descremada a una concentración final del 2%.

1x10⁸ de células Jurkat T de leucemia se centrifugaron a 1 200 r.p.m, durante 6 min., a 4°C y resuspendieron en 1,5 ml de PBS lácteo al 2% añadiendo subsecuentemente caldo de fagos y mezclando con una pipeta. Se incubaron entonces durante 24 horas a 4°C, a rotación baja.

La mezcla de incubación de fagos-células se centrifugó a 300 g durante 6 min., a 4°C. El material flotante se descartó y lavó tres veces en 15 ml PBS, recentrifugó y se recolectó el material flotante. Se centrifugaron 2x10⁷ células Ramos a 300xg, durante 6 min. a 4°C y resuspendieron en una mezcla recolectada de fago a partir de preselección negativa e incubaron a 4°C durante 4 horas con remoción lenta.

La mezcla de incubación fagos/Ramos se centrifugó y descartó el material flotante y las células Ramos se lavaron tres veces en 15 ml PBS.

Los fagos se eluyeron de las células añadiendo 150 ml de 76 mM de ácido cítrico (pH 2,5) en PBS seguido de incubación a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se neutralizó añadiendo 200 ml de 1M Tris-HCl, pH 7,4. Las células se centrifugaron y se guardó el fago eluido.

Las células se resuspendieron en 1 ml de tripsina, transfirieron a un nuevo tubo e incubaron durante 10 min. Entonces se inactivaron con 40 ml 1 mg/ml de aprotinina, centrifugaron y se guardó el material flotante para dosificación.

Amplificación en placas grandes luego de rondas de selección 1 y 2

1. Se comenzaron con tubos de 3x10 ml F' HB101 (uno para cada selección a llevar a cabo + medición de uno por OD₆₀₀) de 2,5-3 horas antes de uso. Se utilizaron 50 µl de cultivo reposado durante la noche a 10 ml de LB contentivos de 15 µg/ml tet. OD se chequeó en un cultivo después de 2,5 horas aproximadamente.

2. Los tubos se infectaron con la mitad del fago eluido a OD₆₀₀=0,5

3. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 50 r.p.m, y para definición apropiada de fenotipo unos 30 min. a 37°C, 200 r.p.m.

4. Las bacterias se concentraron (10 ml) mediante centrifugación durante 10 minutos a 2060xg (3 000 r.p.m Beckman GS-6).

5. Se resuspendieron entonces en parte del material flotante (aproximadamente 3 ml) y distribuyeron en una placa grande de 500 cm² (100 µg/ml de amp+15 µg/ml de tet+1% de glu)/selección.

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

7. Se recolectaron las bacterias de las placas añadiendo 5 ml de LB (100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de tetraciclina) por placa y se retiró la bacteria mediante raspado. Se ladeó la placa y aspiró la solución.

8. Las placas se lavaron con 3 ml de medio LB adicionales como anteriormente y combinaron con la primera suspensión bacteriana en un tubo Falcon de 50 ml.

9. Las bacterias se concentraron por centrifugación durante 10 minutos a 2 100xg/3 000 r.p.m, Beckman GS6 a temperatura ambiente y resuspendieron en 1 ml de LB (+ 100 µg/ml de amp y 15 µg/ml de tet).

ES 2 314 280 T3

10. 500 μ l al 50% de glicerol se añadieron a 1 ml (transferidos de un volumen mayor como se utilizó en 5) y se congeló el caldo de glicerol a -80°C.

5 11. 2x10 ml LB + amp (100 μ g/ml) + tet (15 μ g/ml) se infectaron con 2,5 μ l (5 μ l) del caldo de glicerol del paso 10, y cultivaron hasta OD₆₀₀=0,5.

12. 6x10⁹ PFU de fagos de ayuda R408 se añadieron por ml de cultivo e incubaron durante 30 minutos a 37°C y 50 r.p.m.

10 13. La solución IPTG se añadió a una concentración final de 100 μ M (i.e. 2 μ l de 0,5 de caldo por 10 ml de cultivo e incubaron durante la noche a 25°C (la formación pili se inhibe a temperatura mayor) y 175 r.p.m.

Cosecha y precipitación de caldo de fagos amplificados

15 1. Las bacterias se llevaron a pellas durante 10 minutos a temperatura ambiente. 2 100xg (3 000 r.p.m, en Beckman GS-6) y el material flotante estéril se filtró a través de un filtro estéril 0,2 μ m.

20 2. Los tubos apropiados se combinaron y los fagos se precipitaron añadiendo ¼ de volumen de búfer de precipitación de fago e incubaron durante al menos 4 horas a 4°C (y puede incubarse durante semanas).

3. Los tubos se centrifugaron entonces durante 30 minutos a 4°C y 13.000xg.

25 4. El gránulo se suspendió completamente en 100 μ l PBS durante la noche a 4°C.

Dosificación de fagos

Materiales: cultivo durante la noche de *E. coli* HB 101 F'

30 Placa de microdosificación fondo en V

1xPBS (estéril)

35 Medio LB

LA+amp (100 μ g/ml)+tet (15 μ g/ml)+ placas de glucosa al 1%

40 1. Se inocularon 10 ml LB+tet (15 μ g/ml) con 100 μ l de un cultivo reposado durante la noche de *E. coli* HB101 F' e incubado a 37°C, 175 r.p.m, hasta =OD₆₀₀ = 0,5 (aproximadamente de 2 a 2,5 horas).

2. Para caldos amplificados de fago, los fagos se diluyeron 10⁵ veces en PBS en una placa de microdosificación de fondo en V antes de infección. El fago eluido se utilizó no diluido para infección (véase adelante).

45 3. Cuando las células *E. coli* alcanzaron OD₆₀₀= 0,5, 100 μ l del cultivo se transfirieron a cada segundo pocillo de la primera columna de pocillos en una placa de microdosificación de fondo en V. Los tres pocillos siguientes en la fila se llenaron con 90 μ l de medio LB.

50 4. Se transfirieron 10 μ l de caldo de fagos (diluidos o no diluidos como arriba) a 100 μ l de bacteria en la placa de microdosificación e incubaron durante 30 min. a 37°C, 50 r.p.m.

5. Las bacterias infectadas se diluyeron transfiriendo secuencialmente 10 μ l de cada pocillo al próximo pocillo lleno con 90 μ l LB.

55 8. 10 μ l de cada pocillo se mancharon en una placa seca La+amp+tet+1% de glu utilizando una pipeta multicanales con cada segunda punta eliminada, i.e. con solo cuatro puntas. Se mancharon 4 x 5 manchas en cada placa LA y se le permitió secarse antes de invertir las placas para incubación a 37°C.

60 9. Las colonias se contaron y se calculó la dosificación (CFU/ml), (CFU x dilución x 100).

65

ES 2 314 280 T3

Titulaciones realizadas

TABLA IV

		Diluciones
Después ronda selección 1	Comienza combinación (pool)	$10^7 \times 10^8 \times 10^9 \times 10^{10} \times 10^{11}$
	HB101F' BnonT-C.1 eluido	$10^2 \times 10^3 \times 10^4 \times 10^5 \times 10^6$
Después ronda selección 2	HB101 F' BnonT-C.1 amplificado	$10^7 \times 10^8 \times 10^9 \times 10^{10} \times 10^{11}$
	HB101F' BnonT-C.2	$10^5 \times 10^6 \times 10^7 \times 10^8 \times 10^9$
Después ronda selección 3	HB101 F' BnonT-C.2 amplificado	$10^7 \times 10^8 \times 10^9 \times 10^{10} \times 10^{11}$
	HB101F' BnonT-C.3	$10^5 \times 10^6 \times 10^7 \times 10^8 \times 10^9$

Amplificación en placas de caldo de glicerol, y cultivo reposado durante la noche respecto a minipreparados (seguido de ronda de selección 3)

Materiales de reacción

Se necesitan 3 x 10 ml HB101 F' con OD 0,5 (10 ml por cada objetivo y 10 ml para dosificación) y se necesitan 3 placas grandes de 500 cm² (amp+tet+glu).

Método

Para cada selección:

1. La mitad de cada eluido de la selección 3 se utiliza para infectar 10 ml de bacterias de fase log ($OD_{600} = 0,5$) que entonces se incuban durante 30 min a 37°C, 175 r.p.m, 10 ml de medio tibio contentivo de 200 µg/ml de ampicilina se añaden y dividen en 2 partes de 10 ml cada una.

2. Las bacterias se concentraron (10 ml) mediante centrifugación durante 10 minutos a 2 100 xg/3 000 r.p.m, Beckman GS-6 50 a temperatura ambiente y resuspendieron en un pequeño volumen a ser distribuido sobre una placa de 500 cm² µg/ml tet+1% glu) y cultivaron durante la noche a 30°C.

3. Minipreparaciones: 10 ml se revolviaron y resuspendieron en 6 ml de LB contentivo de 0,1% de glucosa y 100 µg/ml de ámpula y cultivaron durante la noche a 30°C.

4. Las bacterias se recolectaron de las placas añadiendo 3-5 ml de LB (100 µg/ml ampicilina, 15 µg/ml tetraciclina) por placa y se rasparon respecto a bacterias. La placa se inclinó y se aspiró la solución.

5. Las bacterias se concentraron mediante centrifugación durante 10 minutos a 2100xg/3 000 r.p.m, Beckman GS6 a temperatura ambiente y resuspendieron en 1 ml de LB (+Amp/Tet como arriba). Añadiendo 500 µl al 50% de glicerol y caldo de glicerol congelado a -80°C.

6. Las minipreparaciones se prepararon a partir de 3 ml de cultivo según protocolo de kit de fabricante (BioRad).

Conversión a formato scFv después de la selección 3

El vector pMI se digirió con *EagI*, una enzima que corta en ambos lados del gen III. El vector fue entonces religado seguido de un corte de destrucción utilizando EcoRI. Esta enzima tiene un sitio en el gen III y por tanto destruirá vectores no convertidos.

Se preparó una mezcla de digestión utilizando:

Fagémido 6,25 µl (0,21-0,66 µg)

Búfer NE 3 0,75 µl

EagI (10 U/µl) 0,5 µl

MQ-H₂O añadido a 7,5 µl e incubado a 37°C durante 2 h con inactivación por calor durante 20 min. a 65°C.

ES 2 314 280 T3

La ligación del vector se lleva a cabo con

Fagémido Eagl digerido 3 μ l

5 MQ-H₂O 20 μ l incubado durante 5 min. a 45°C y puesto sobre hielo

Búfer 5x ligasa 6 μ l

10 T4ADN ligasa (1U/ μ l) 1 μ l

30 μ l incubados durante dos horas a temperatura ambiente e inactivados a 65°C durante 10 minutos.

15 El corte de destrucción se lleva a cabo con

Material ligado 30 μ l

20 10x REACT®3 3,6 μ l

EcoRI (10 U/ μ l) 2 μ l

1 M NaCl 0,4 μ l

25 MQ-H₂O 4,0 μ l

40 μ l incubados durante 90 min. a 37°C e inactivados por calor durante 10 Minutos a 65°C.

30 El ligado se almacena a 4°C hasta su uso.

Transformación

35 El ligado anteriormente producido se transformó en *E. coli* TOP10, véase tabla más adelante.

Un tubo (100 μ l/tubo) de células TOP10 químicamente competentes se descongelaron e incubaron en hielo durante 10 min. Se añadieron 10 ng de ligado por tubo (3,2 μ l ligados producidos anteriormente) e incubaron en hielo durante 30 min.

40 Los tubos se incubaron luego a 42°C (baño de agua) durante 90 s, y luego se incubaron en hielo durante 1-2 min.

Se añadieron 900 μ l LB a cada tubo y se incubaron a 37°C, 1 h, 200 r.p.m.

45 El contenido de cada tubo se distribuyó sobre una placa grande LA-Amp (100 μ g/ml) - Glu (1%), e incubó durante la noche a 37°C.

Recogida de colonias

50 Un total de 960 clones se seleccionaron de cada una de las dos selecciones de las placas grandes LB de 10x96 pocillos por placa de microdosificación utilizando un sistema de selección de colonia Genetix "Q-bot"

55 1) El medio LB se mezcló con antibióticos apropiados y glucosa al 1% y se llenaron placas Greiner Flat 655501 de 96 pocillos con medio, 150 μ l/pocillo.

2) Las colonias se seleccionaron con el Q-Bot de acuerdo al protocolo, y las placas se incubaron a 37°C durante la noche sin remover.

60 *Expresión de clones en formato de 96 pocillos*

65 1) La placa de expresión (Greiner Round 650101 de 96 pocillos) se llenó con el medio, 100 μ l/pozo, incluyendo antibióticos apropiados e inoculó con 5 μ l/pocillo a partir de la placa maestra y la placa de expresión incubada a 37°C, 600 r.p.m durante 3,5 horas.

2) La producción de scFv se indujo con 25 μ l/pocillo del medio incluyendo antibióticos apropiados y 2,5 mM IPTG.

ES 2 314 280 T3

3) La placa de expresión se incubó durante 10 horas a 37°C, 600 r.p.m.

4) Se añadieron 80 μ l de 1 M PBS a la placa de filtro y se añadió filtro a la placa de caldo.

5) Se transfirieron 80 μ l de la placa de expresión a la placa de filtro y del filtro a la placa de caldo. La placa de caldo se almacenó a +4°C.

Identificación de clones en formato de 96 pocillos

Los clones se identificaron en un sistema macro confocal FMAT 8100 HTS Applied Biosciences, Foster City, CA, USA). Se establecieron barreras usando anticuerpos monoclonales específicos de células B y T (anti-CD19 y anti-CD3 respectivamente) de manera que la señal positiva de la célula B se obtuviera solo con manchar con el anticuerpo primario anti-CD19, y la señal positiva de la célula T solo con el anticuerpo primario anti-CD3. (FL1<10666, FL2<2026, Color:0.17-0.425, Tamaño 10.0-66.66).

Materiales

α CD45 0,5 mg/ml (BD Biosciences cat no 555480)

α CD19 0,5 mg/ml (BD Biosciences cat no 555410)

α CD3 0,5 mg/ml (BD Biosciences cat no 555330)

Clon purificado 31 0,154 mg/ml 010515 KMN

α -HIS (R&D Systems MAB050, 8,43 mg/ml)

α ratón-Cy5 (Amersham Bioscience PA45002)

PBS (Gibco, Cat no 14040-091)

Búfer Hepes (Gibco, Cat no 15630-056)

Búfer: PBS+10% Hepes buffer

Medio celular: RPMI 1640 con 10% FCS, 10 mM Hepes, medio LB 1 mM Piruvirato de Sodio

Método

1) 10 000 células/pocillo diluidas en medio celular, se añadieron a 40 μ l/pocillo de cultivo por pocillo a 37°C, 5% CO₂.

2. 10 μ l/pocillo de scFv se añadieron a una placa con células B y una placa con células T. También se añadió α -CD45 a la columna 2, α -CD19 a la columna 3 y α -CD3 a la columna 4, y las placas se incubaron durante 1 hora.

3) se añadió α -ratón-Cy5 diluida en búfer, 20 μ l/pocillo (dilución 1:1 000, dilución final, dilución de trabajo 1:286) a las placas de control α -ratón cy5 + α His diluido en búfer, se añadió también (dilución 1:1 000 y 1:5 000 dilución final, 1:286 y 1:1 429 dilución de trabajo)

4) Las placas se leyeron en los sistemas FMAT 8100 HTS después de 4 horas. La lectura se repitió después de una incubación durante la noche.

Ejemplo 11

Composiciones farmacéuticas

Un ejemplo ulterior de la presente invención brinda una composición farmacéutica que comprende un antiligando (el ingrediente activo) aislado de acuerdo con el método de la presente invención.

Los compuestos antes mencionados de la presente invención o una formulación de ésta pueden administrarse mediante cualquier método convencional incluyendo oral y parenteral (e.g. inyección subcutánea o intramuscular). El tratamiento puede consistir de una sola dosis o una pluralidad de dosis durante un período de tiempo.

Aunque es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica, conjuntamente con uno o más portadores aceptables. El(os) portador(es) puede(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible con el compuesto de la presente invención y no afecte al recipiente de éste. Típicamente, los portadores serán agua o solución salina que será estéril y libre de pirógeno.

Ejemplo 12

Identificación sin cultivo de células

- 5 La presente invención permite la biomarcación y descubrimiento del objetivo directamente a nivel de la proteína utilizando por ejemplo bibliotecas moleculares altamente diversificadas. El presente ejemplo profético demuestra su aplicabilidad para aislamiento selectivo de enlazadores con especificidad a antígenos sobreexpresados o únicos en una muestra de plasma (e.g. de un paciente con cáncer) comparado con otro (de un control sano).
- 10 Una biblioteca molecular altamente diversificada que contiene 10^{11} miembros de genotipo único en un número de copia de enlazador de aproximadamente veinte (número efectivo de enlazadores que exponen capacidad de enlace, ejemplos no expuestos se retiran mediante afinidad de purificación) se precipita mediante tratamiento con glicol de polietileno y resuspensión en 20 ml de solución al 10% leche-PBS. Los enlazadores aislados de la selección utilizando esta biblioteca tienen una afinidad nanomolar ($K_d=1 \times 10^{-9}$) para el antígeno relevante.
- 15 Plasma entero (albúmina y alguna otra proteína grande de gran abundancia que no se sospecha difiera entre los dos pacientes se retira mediante cromatografía de exclusión de talla) de un paciente con cáncer y un control sano se recolectan y tratan como sigue:
- 20 La muestra de plasma del paciente con cáncer se divide y biotinila en tres posiciones de aminoácido diferentes, para minimizar la pérdida de epítopes relevantes de antígeno que se destruyen mediante el proceso de biotinilado químico.
- El plasma de control se somete a un tratamiento superficial (tratamiento sin adición de biotina). El plasma de control se concentra entonces cuarenta veces mediante tratamiento apropiado, y se mezcla subsiguientemente en iguales volúmenes con la muestra de plasma del paciente de cáncer (volumen total = 1,0 ml)
- La mezcla producida se mezcla con la biblioteca molecular bloqueada anterior, y la mezcla producida plasma/enlazador se incuba durante la noche a 4°C a rotación lenta extremo sobre extremo.
- 30 Luego del biocernido de selección, las perlas de captura e.g. partículas magnéticas cubiertas con estreptavidina (recubrimiento de estreptavidina μ MACS de Miltenyi, USA; diámetro de la perla = 50 nm) se añaden y utilizan para aislar proteínas biotiniladas de la muestra de plasma del paciente con cáncer y a los enlazadores enlazados mediante antígeno de la biblioteca molecular (Siegel *et al.*, 1997).
- 35 Las perlas magnéticas se añaden a una proporción molar suficiente para capturar todo el antígeno biotinilado añadido (equivalente a la concentración total de la proteína biotinilada del plasma del paciente con cáncer).
- La mezcla se transfiere a una columna de separación magnética pretratada como describe Siegel, L. *et al.*, J Immunol Methods, 206 (1997), pp73-85:
- 40 1. Antes de la adición de la suspensión de selección, la columna MACS se carga con BSA-PBA (BPBS) al 2% para llenar la parte inferior (que luego estará fuera del campo magnético) y de esta forma la mezcla de la selección añadida subsecuentemente se distribuirá proporcionalmente sin tuplición a través de la parte "magnética" de la columna. Una
- 45 aguja calibre 30, x1/2 pulgada se monta en el puerto de salida de las columnas para restringir la velocidad de flujo a $\sim 10 \mu\text{l}/\text{min}$.
2. Una vez cargada, la columna se coloca dentro de la magneto durante 2 min.
- 50 3. Un total de tres lavados con BPBS se llevan a cabo para cada ronda de selección, la primera de las cuales se lleva a cabo con la aguja sujeta al puerto de salida de la columna, y se llevan a cabo lavados subsecuentes sin una aguja de restricción del flujo (velocidad del flujo $\sim 200 \mu\text{l}/\text{min}$).
4. Luego del último lavado, la columna se retira de la magneto y las perlas recubiertas/recubrimiento por fagos/antígeno biotiniladas se descargan fuera de la columna con 500 ml de PBS utilizando el émbolo de una jeringa de 5 cc (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).
- 55 5. La elución se lleva a cabo mediante ácido, base u otros medios igualmente apropiados (e.g. escisión enzimática si los miembros de la biblioteca molecular contienen un sitio específico de escisión de enzima).
- 60 6. Las perlas se centrifugan, y los enlazadores eluidos se guardan y dosifican.
- Utilizando el esquema experimental anterior, uno puede esperar el aislar enlazadores con especificidad para antígenos diez veces o más sobreexpresados (o presentes de manera única) en la muestra de plasma del paciente en comparación con la muestra de plasma de control y presente a niveles subnanomolares (o mayores) en la muestra del paciente con cáncer, a la vez que elimina los enlazadores con especificidad para antígenos presentes en abundancia igual en las muestras del paciente original con cáncer y del paciente de control.
- 65

ES 2 314 280 T3

La Tabla V muestra los números relativos esperados (teóricos, asumiendo que no hay disociación de enlazadores nanomolares durante el lavado) de los enlazadores con especificidad para diferentes categorías de antígeno.

TABLA V

Categoría de Enlazador	Concentración de antígeno en plasma, paciente con cáncer (moles/ litro)	Concentración de antígeno en plasma, paciente control sano (moles/ litro)	Kd=1x10-9M entrada N° copia enlazador específico antígeno	Enlazador aislado luego del biocernido
Antígeno restringido, célula positiva	3.3×10^{-8}	0.00E+00	2.00E+0	19
Antígeno enriquecido, célula positiva	3.3×10^{-8}	3.3×10^{-9}	2.00E+01	4
Antígeno enriquecido, célula positiva	3.3×10^{-8}	3.3×10^{-10}	2.00E+01	14
Antígeno enriquecido, célula positiva	3.3×10^{-9}	3.3×10^{-10}	2.00E+01	4
Antígeno enriquecido célula positiva	3.3×10^{-10}	3.3×10^{-11}	2.00E+01	2
Antígeno enriquecido, célula positiva	1×10^{-10}	0	2.00E+01	1
Antígeno común (altamente expresado)	3.3×10^{-6}	3.3×10^{-6}	2.00E+01	0
Antígeno común (moderadamente expresado)	3.3×10^{-8}	3.3×10^{-8}	2.00E+01	0

La biblioteca molecular puede sustituirse por compuestos químicos producidos de forma sintética. Seguiría siendo necesario aproximarse a la afinidad más alta probable a los compuestos químicos objetivo en la “biblioteca química” a ser aislados y el número/concentración de cada compuesto químico modificado añadido.

Ejemplo 13

Uso de las ecuaciones para determinar el nivel de adecuación de una biblioteca molecular conocida en la ejecución de la presente invención

Las ecuaciones de la presente invención pueden utilizarse para evaluar bibliotecas moleculares de parámetros conocidos (incluyendo cantidades conocidas) respecto a su nivel de adecuación para aislar los antilíngandos con una especificidad dada. E.g. el uso de las ecuaciones puede determinar la cantidad de ligando sustractivo y/u objetivo requerido para aislar a los enlazadores requeridos y puede compararse a las cantidades conocidas en un ejemplo provisto, para poder determinar si está presente una cantidad suficiente de ligando.

Ejemplo 14

Realización de la presente invención mediante métodos automáticos

La identificación de ligandos utilizando el método de la presente invención puede llevarse a cabo utilizando diversos niveles de automatización. La determinación de la cantidad del primer ligando sustractivo y segundo objetivo puede llevarse a cabo utilizando un programa informático diseñado para correr las ecuaciones derivadas de la ley de acción de masas.

ES 2 314 280 T3

Aún más el método de identificación puede automatizarse más de ser necesario para obtener una identificación de alta productividad. En esta situación, la determinación automática de la cantidad de primer y segundo ligandos objetivo, es seguida de la provisión automática de cantidades determinadas de primer y segundo ligandos objetivo y la exposición automática de ligandos al antiligando.

A continuación se describe una reseña de un software informático que utiliza la presente invención para automatizar los procesos de selección de enlazador.

Al usuario se le pedirá elegir un programa de selección. En un modo “simple” tales programas incluirían:

A. análisis de la dependencia de la abundancia de interpoblación de ligando positivo a negativo y aislamiento de enlazadores independientes de abundancia de intrapoblación de ligando (a mayor precisión, una necesidad de mayores concentraciones de antígeno). Este programa es ideal para el descubrimiento del biomarcador u objetivo). (e.g. figura 5)

B. análisis de la dependencia de la abundancia de interpoblación de ligando positivo a negativo y aislamiento de enlazadores dependientes de abundancia de intrapoblación de población de ligandos (a menor precisión, la necesidad de menores concentraciones de antígeno) (e.g. figura 2). Este programa tendría diferentes subprogramas, e.g. “selección de célula transfectada”, “selección de célula de tipo natural” o “selección de plasma”. En dependencia de que tipo de selección se elija el software estimará las frecuencias relativas de ligandos objetivo presentes a diferentes números absolutos y relativos en las poblaciones de ligando positivo y negativo. El usuario puede elegir dar entrada manualmente a estos números.

Al usuario se le pedirá que especifique qué categoría de enlazadores es de interés. El usuario puede elegir para llevar a cabo la selección de manera que solo se aislen marcadores con especificidad para poblaciones de ligandos únicos positivos, o elegir la inclusión de enlazadores con especificidad para ligandos presentes en mayor concentración en la población de ligando positivo en comparación con la población de ligandos negativos. El usuario también brindará información sobre la biblioteca de enlazadores:

1. Diversidad de biblioteca (número de enlazadores únicos). Este valor se utiliza para establecer un umbral más alto respecto a la afinidad de enlazador.

2. Número de copias de biblioteca de enlazador - la multiplicidad de cada miembro único de biblioteca.

3. Volumen de selección de reacción (litros)

4. Umbral respecto a afinidad de enlazador (K_d) (M) - Este valor responde a la afinidad más baja de interés de cualquier enlazador respecto a su ligando objetivo. El umbral superior para este valor se determina a partir de 1.

5. El valor esperado de las veces que cada enlazador se multiplicará luego de una ronda de selección (“el factor de amplificación”). El factor de amplificación se calcula como el número de fagos luego de amplificación de enlazadores aislados a partir de una ronda dada de selección, dividido entre el número de enlazadores aislados por el factor de amplificación actual. El factor de amplificación esperado se reemplaza por el factor de amplificación actual calculado a medida que se llevan a cabo rondas de selección de manera que se optimice cada ronda de selección.

6. El número más bajo aceptado de enlazadores únicos aislados luego de cada ronda de selección. Este número pudiera ser cualquiera menor que 1 al número de copias de entrada del enlazador.

7. Disponibilidad de construcciones de ligando sustractivo (el número más alto de construcciones de sustractivo que está disponible y que puede utilizarse en el proceso de selección).

8. “Nivel de detección de ligando”. La concentración aproximada del ligando objetivo de interés de menor abundancia e la población de ligando positivo. Los enlazadores específicos para ligando objetivo presentes en concentraciones más bajas que la aquí especificada puede esperarse que no sean aislados.

9. Frecuencia deseada de enlazadores con especificidad para los ligandos menos frecuentes o débilmente sobreexpresados, luego de la ronda final de selección.

Dados los parámetros anteriores, el programa informático calculará el número de rondas de selección necesarias para enlazadores con especificidad y afinidad buscadas a ser aislados a una frecuencia deseada (basado en valores de parámetros de entrada), y el número de construcciones de ligando positivo y negativo a utilizar en las rondas de selección respectivamente. Todos o ninguno de los parámetros entrados para una selección dada pueden guardarse y utilizarse para selecciones subsecuentes.

Aún más, la salida concerniente a las cantidades de cualquier material y el número de rondas de selección puede vincularse a través del software a un esquema experimental automatizado en el que los datos de entrada del usuario permitan el cálculo automático e implementación de los materiales experimentales requeridos.

Referencias

- 5 ■ **Barbas CF, Kang As, Lerner RA and Benkovic SJ, (1991)**, Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7978-7982;
- **Carlsson, R., Fischer, H. and Sjogren, H.O. (1988)** Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *J Immunol* 140, 2484.
- 10 ■ **Chiswell DJ and McCafferty J, (1992)**, Phage antibodies: will new “coliclonal” antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.* 10, 80-84
- **Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD and Winter G, (1991)**, Making antibody fragments using phage display 15 libraries. *Nature* 352, 624-628
- 15 ■ **de Kruif, J., Terstappen, L., Boel, E. and Logtenberg, T. (1995)** Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3938.
- **Dower, W.J., CWIRLA, S.E. and N.V., A.T. (1991)** Recombinant Library Screening Methods. In: World Intellectual Property Organization. *SMITH, W.M.*, United States.
- 20 ■ **Felici F, Luzzago A, Manaci P, Nicosia A, Sollazzo M and Traboni C, (1995)**, Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage. *Biotechnol. Annual Rev.* 1, 149-183.
- 25 ■ **Francisco, J.A., Stathopoulos, C., Warren, R.A., Kilburn, D.G. and Georgiou, G. (1993)** Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Biotechnology* (N Y) 11, 491.
- **Gao, C., Lin, C.H., Lo, C.H., Mao, S., Wirsching, P., Lerner, R.A. and Janda, K.D. (1997)** Making chemistry selectable by linking it to infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 11777.
- 30 ■ **Hanes, J. and Pluckthun, A. (1997)** *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4937.
- 35 ■ **He, M. and Taussig, M.J. (1997)** Antibody-ribosome-m RNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res* 25, 5132.
- **Hoogenboom HR and Winter G, (1992)**, By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 227, 381-388).
- 40 ■ **Hoogenboom HR, deBruine AP, Hutton SE, Hoet RM, Arends JW and Rooves RC, (1998)**, Antibody phage display technology and its application. *Immunotechnology* 4(1), 1-20.
- 45 ■ **Huls, G.A., Heijnen, I.A., Cuomo, M.E., Koningsberger, J.C., Wiegman, L., Boel, E., van der Vuurst de Vries, A.R.,**
- **Loyson, S.A., Helfrich, W., van Berge Henegouwen, G. P., van Meijer, M., de Kruif, J. and Logtenberg, T. (1999)** A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnology* 17, 276.
- 50 ■ **Jacobsson, K. and Frykberg, L. (1995)** Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display. *Biotechniques* 18, 878.
- **Katz BA, (1997)**, Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by peptide display. *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 27-45.
- 55 ■ **Kay BK and Paul JI, (1996)**, High-throughput screening strategies to identify inhibitors of protein-protein interactions. *Mol. Divers.* 1, 139-140).
- 60 ■ **Koide, A., Bailey, C.W., Huang, X. and Koide, S. (1998)** The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 284, 1141.
- **Mandecki, W., Chen, Y.C. J. and Grialde N (1995)** A mathematical model fro biopanning (affinity selection) using peptide libraries on filamentous phage. *J. theor. Biol.* 176, pp 523-530.
- 65 ■ **Markland, W., Roberts, B.L., Saxena, M.J., Guterman, S.K. and Ladner, R.C. (1991)** Design, construction and function of a multicopy display vector using fusions to the major coat protein of bacteriophage M13. *Gene* 109, 13.

■ **Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD and Winter G, (1991)**, By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581-597.

■ **Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J. (1994)** An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9022.

■ **McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990)** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552.

■ **Siegel, D.L., Chang, T.Y., Russell, S.L. and Bunya, V.Y. (1997)** Isolation of cell surface-specific human monoclonal 20 antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology. *J Immunol Methods* 206, 73.

■ **Smith, G.P. (1985)** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315.

■ **Smith, G.P. and Scott, J.K. (1993)** Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 217, 228.

■ **Stahl, S., Sjolander, A., Nygren, P.A., Berzins, K., Perlmann, P. and Uhlen, M. (1989)** A dual expression system for the generation, analysis and purification of antibodies to a repeated sequence of the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA. *J Immunol Methods* 124, 43.

■ **Stausbøl-Grøn, B., Wind, T., Kjaer, S., Kahns, L., Hansen, N., Kristensen, P., and Clark, B. (1996)** A model phage display subtraction method with potential for analysis of differential gene expression. *Febs Letters*, 391, pp 71-75.

■ **Stausbøl-Grøn, B., Jensen, K. B., Jensen, K. H., Jensen, M. and Clark, B. (2001)** De novo identification of cell-type specific antibody-antigen pairs by phage display subtraction, *Eur. J. Biochem.*, 268, 3099-3107.

■ **Weng, S., Gu, K., Hammond, P.W., Lohse, P., Rise, C., Wagner, R.W., Wright, M.C. and Kuimelis, R.G. (2002)** Generating addressable protein microarrays with PROfusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics* 2,48.

■ **Williams, B.R. and Sharon, J. (2002)** Polyclonal anti-colorectal cancer Fab phage display library selected in one round using density gradient centrifugation to separate antigen-bound and free phage. *Immunol Lett* 81, 141.

■ **Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. (1994)** Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433.

■ **Winter and McCafferty (1996)** Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual Ed Kay, *Academic Press, Inc ISBN 0-12-402380-0*.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0052054 A

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. 1996

- **SIEGEL, L. et al. J Immunol Methods, 1997, vol. 206, 73-85**

• **BARBAS CF; KANG AS; LERNER RA; BENKOVIC SJ.** Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982

• **CARLSSON, R.; FISCHER, H.; SJOGREN, H.O.** Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *J Immunol*, 1988, vol. 140, 2484

- **CHISWELL DJ; MCCAFFERTY J.** Phage antibodies: will new “coliclonal” antibodies replace monoclonal antibodies?. *Trends Biotechnol.*, 1992, vol. 10, 80-84
- **CLACKSON T; HOOGENBOOM HR; GRIFFITHS AD; WINTER G.** Making antibody fragments using
5 phage display libraries. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628
- **DE KRUIF, J.; TERSTAPPEN, L.; BOEL, E.; LOGTENBERG, T.** Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, vol. 92, 3938
- **DOWER, W.J.; CWIRLA, S.E.; N.V., A.T.** Recombinant Library Screening Methods. *World Intellectual Property Organization*, 1991
- **FELICI F; LUZZAGO A; MANACI P; NICOSIA A; SOLLAZZO M; TRABONI C.** Peptide and protein
15 display on the surface of filamentous bacteriophage. *Biotechnol. Annual Rev.*, 1995, vol. 1, 149-183
- **FRANCISCO, J.A.; STATHOPOULOS, C.; WARREN, R.A.; KILBURN, D.G.; GEORGIU, G.** Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Biotechnology (N Y)*, 1993, vol. 11, 491
- **GAO, C.; LIN, C.H.; LO, C.H.; MAO, S.; WIRSCHING, P.; LERNER, R.A.; JANDA, K.D.** Making chemistry
20 selectable by linking it to infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 11777
- **HANES, J.; PLUCKTHUN, A.** *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display.
25 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, vol. 94, 4937
- **HE, M.; TAUSSIG, M.J.** Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25, 5132
- **HOOGENBOOM HR; WINTER G.** By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 381-388
- **HOOGENBOOM HR; DEBRUINE AP; HUTTON SE; HOET RM; ARENDS JW; ROOVES RC.** Antibody
35 phage display technology and its application. *Immunotechnology*, 1998, vol. 4 (1), 1-20
- **HULS, G.A.; HEIJNEN, I.A.; CUOMO, M.E.; KONINGSBERGER, J.C.; WIEGMAN, L.; BOEL, E.; VAN DER VUURST DE VRIES, A.R.; LOYSON, S.A.; HELFRICH, W.; VAN BERGE HENEGOUWEN, G.P.** A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnology*, 1999, vol. 17, 276
- **JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L.** Cloning of ligand- binding domains of bacterial receptors by phage display. *Biotechniques*, 1995, vol. 18, 878
- **KATZ BA.** Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered
45 by peptide display. *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1997, vol. 26, 27-45
- **KAYBK; PAUL JI.** High-throughput screening strategies to identify inhibitors of protein-protein interactions. *Mol. Divers.*, 1996, vol. 1, 139-140
- **KOIDE, A.; BAILEY, C.W.; HUANG, X.; KOIDE, S.** The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol*, 1998, vol. 284, 1141
- **MANDECKI, W.; CHEN, Y.C. J.; GRIHALDE N.** A mathematical model fro biopanning (affinity selection) using peptide libraries on filamentous phage. *J. theor. Biol.*, 1995, vol. 176, 523-530
- **MARKLAND, W.; ROBERTS, B.L.; SAXENA, M.J.; GUTERMAN, S.K.; LADNER, R.C.** Design, construction and function of a multicopy display vector using fusions to the major coat protein of bacteriophage M13. *Gene*,
55 1991, vol. 109, 13
- **MARKSJD; HOOGENBOOMHR; BONNERTTP; MCCAFFERTY J; GRIFFITHS AD; WINTER G.** By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597
- **MATTHEAKIS, L.C.; BHATT, R.R; DOWER, W.J.** An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, 9022
- **MCCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A.D.; WINTER, G.; CHISWELL, D.J.** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, vol. 348, 552

• **SIEGEL, D.L.; CHANG, T.Y.; RUSSELL, S.L.; BUNYA, V.Y.** Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically- activated cell sorting: applications in immunohematology. *J Immunol Methods*, 1997, vol. 206, 73

• **SMITH, G.P.** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, vol. 228, 1315

• **SMITH, G.P.; SCOTT, J.K.** Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol*, 1993, vol. 217, 228

• **STAHL, S.; SJOLANDER, A.; NYGREN, P.A.; BERZINS, K.; PERLMANN, P.; UHLEN, M.** A dual expression system for the generation, analysis and purification of antibodies to a repeated sequence of the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA. *J Immunol Methods*, 1989, vol. 124, 43

• **STAUSBØL-GRØN, B.; WIND, T.; KJAER, S.; KAHNS, L.; HANSEN, N.; KRISTENSEN, P.; CLARK, B.** A model phage display subtraction method with potential for analysis of differential gene expression. *Febs Letters*, 1996, vol. 391, 71-75

• **STAUSBØL-GRØN, B.; JENSEN, K. B.; JENSEN, K. H.; JENSEN, M.; CLARK, B.** De novo identification of cell-type specific antibody-antigen pairs by phage display subtraction. *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol. 268, 3099-3107

• **WENG, S.; GU, K.; HAMMOND, P.W.; LOHSE, P.; RISE, C.; WAGNER, R.W.; WRIGHT, M.C.; KUIME-LIS, R.G.** Generating addressable protein microarrays with PROfusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics*, 2002, vol. 2, 48

• **WILLIAMS, B.R.; SHARON, J.** Polyclonal anti- colorectal cancer Fab phage display library selected in one round using density gradient centrifugation to separate antigen-bound and free phage. *Immunol Lett*, 2002, vol. 81, 141

• **WINTER, G.; GRIFFITHS, A.D.; HAWKINS, R.E.; HOOGENBOOM, H.R.** Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, 1994, vol. 12, 433

• **WINTER; MCCAFFERTY.** Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. *Academic Press*, 1996.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de aislamiento de al menos un antiligando a al menos un ligando objetivo expresado diferencialmente que comprende los pasos de:

- (i) brindar una biblioteca de antiligandos;
- 10 (ii) brindar una primera población de ligandos que comprende un ligando sujeto a o incorporado en una construcción de ligandos sustractivo;
- (iii) brindar una segunda población de ligandos que comprendan al mismo ligando como en el paso (ii), sujeto a o incorporado en una construcción de ligandos objetivos;
- 15 (iv) determinar una cantidad de la construcción de ligandos sustractivo y de la construcción de ligandos objetivos en las poblaciones utilizando una o más de las ecuaciones derivadas de la ley universal de acción de masas

$$20 \quad \frac{[C]^c [d]^d}{[A]^a [B]^b} = K_{eq},$$

25 donde:

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

30 a, b, c, & d = los coeficientes necesarios para una ecuación química balanceada para permitir aislamiento de antiligando a ligando objetivo expresado diferencialmente;

- (v) brindar la cantidad de la construcción de ligandos sustractivo como se determina en el paso (iv);
- 35 (vi) brindar la cantidad de la construcción de ligandos objetivos como se determina en el paso (iv);
- (vii) brindar medios de separación para aislar el antiligando enlazado a la construcción de ligandos objetivos de antiligando enlazado a una construcción de ligandos sustractivo;
- 40 (viii) exponer la biblioteca de (i) a las construcciones de ligando brindadas por (v) y (vi) para permitir enlace de antiligandos a ligandos; y
- (ix) utilizar los medios de separación para aislar el antiligando enlazado al ligando sujeto a o incorporado en la construcción de ligandos objetivos.
- 45

2. Un método de aislamiento de al menos un antiligando a al menos un ligando objetivo expresado diferencialmente que comprende los pasos de:

- 50 (i) brindar conjunto(s) de datos que describen una biblioteca de antiligandos;
- (ii) brindar conjunto(s) de datos que describen una primera población de ligandos que comprenden un ligando sujeto a o incorporado en una construcción de ligandos sustractivo;
- 55 (iii) brindar conjunto(s) de datos que describen una segunda población de ligandos que comprenden al mismo ligando que en el paso (ii) sujeto a o incorporado en una construcción de ligandos objetivos;
- (iv) determinar automáticamente una cantidad de construcción de ligandos sustractivo y construcción de ligandos objetivos en las poblaciones utilizando una o más ecuaciones derivadas de la ley universal de acción de masas
- 60

$$65 \quad \frac{[C]^c [d]^d}{[A]^a [B]^b} = K_{eq},$$

donde:

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

a, b, c, & d = los coeficientes necesarios para una ecuación química balanceada

para permitir aislamiento de antiligando a ligando objetivo expresado diferencialmente;

(v) brindar la cantidad de la construcción de ligandos sustractivo como se determina en el paso (iv);

(vi) brindar la cantidad de la construcción de ligandos objetivos como se determina en el paso (iv);

(vii) brindar una biblioteca de antiligandos descrita por (i);

(viii) brindar medios de separación para aislar el antiligando enlazado a la construcción de ligandos objetivos de antiligando enlazado a construcción de ligandos sustractivo;

(ix) exponer la biblioteca de (vii) a las construcciones de ligandos de (v) y (vi) para permitir enlace de antiligandos a ligandos; y

(x) utilizar los medios de separación para aislar el antiligando enlazado al ligando sujeto a o incorporado en la construcción de ligandos objetivos.

3. Un método como se reivindica en la Reivindicación 2 en el que el paso (iv) y al menos uno de los pasos (v), (vi), (viii), (ix) y (x) se llevan a cabo automáticamente.

4. Un método como se reivindica en cualquiera reivindicación precedente en el que el ligando no se expresa en un ligando sea de la construcción objetivo o de la construcción sustractiva.

5. Un método como se reivindica en cualquiera reivindicación precedente que comprende un paso ulterior de liberación del antiligando del ligando.

6. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que los pasos (ii) al (ix) y/o (x) se llevan a cabo en paralelo para aislar una pluralidad de antiligandos a una pluralidad de diferentes ligandos.

7. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que los pasos (ii) al (ix) y/o (x) se repiten una o más veces.

8. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que la cantidad de una de las construcciones sustractivas o construcciones objetivo se brinda en exceso respecto a la cantidad de la otra construcción sustractiva o construcción objetivo.

9. Un método como se reivindica en la Reivindicación 8 en el que el exceso de ligando está entre 10 y 100 veces.

10. Un método como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a la 9 en el que la ecuación de (iv) es:

$$bA = \frac{(A + T + (K_d) \times (C \times V))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d) \times (C \times V))^2}{4} - A \times T}$$

donde:

bA = antiligando enlazado

A = número total de antiligando

T = número total de ligandos

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

V = volumen de reacción (litros)

K_d = constante de equilibrio de disociación.

11. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 9 en el que la ecuación de (iv) es:

$$bA = \left\{ \frac{(A + T + (K_d)x(CxI'))}{2} - \sqrt{\frac{(A + T + (K_d)x(CxI'))^2}{4} - AxT} \right\} x \left\{ \frac{(T_p x C_p)}{((T_p x C_p) + (T_s x C_s))} \right\}$$

donde:

bAp = antiligando enlazado

T_p = el número de ligandos en C_p

T_s = el número de ligandos en C_s

C_p = el número de construcciones de ligandos objetivos

C_s = el número de construcciones de ligandos sustractivos

A = número total de antiligando

T = número total de ligandos

C = constante de Avogadro (6,022 x 10²³ partículas/mol)

V = volumen de reacción (litros)

K_d = constante de equilibrio de disociación.

12. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que los medios de separación se seleccionan de entre al menos uno de un soporte sólido, membrana celular y/o porciones de ésta, membrana sintética, perlas, etiquetas químicas y ligando libre.

13. Un método como se reivindica en la Reivindicación 12 en el que los medios de separación son membranas celulares y/o porciones de éstas.

14. Un método como se reivindica en la Reivindicación 13 en el que los ligandos se sujetan a y/o incorporan dentro de membranas celulares separadas y/o porciones de éstas.

15. Un método como se reivindica en la Reivindicación 13 o 14 en el que los medios de separación de las construcciones sustractivas u objetivo tienen una densidad diferente.

16. Un método como se reivindica en la Reivindicación 15 en el que los medios de separación de la construcción sustractiva son de una densidad inferior respecto a los medios de separación de la construcción objetivo.

17. Un método como se reivindica en la Reivindicación 14 en el que los medios de separación de la construcción sustractiva son una vesícula de membranas.

18. Un método como se reivindica en la Reivindicación 16 en el que los medios de separación de la construcción objetivo son una membrana de célula entera.

19. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que el paso (ix) se lleva a cabo mediante al menos uno entre centrifugación por densidad; secuestro por soporte sólido, secuestro por perla magnética, enlace de etiqueta química y partición de fase acuosa.

20. Un método como se reivindica en la Reivindicación 19 en el que la centrifugación por densidad se lleva a cabo utilizando un gradiente de Ficoll.

21. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que la biblioteca del paso (i) es una biblioteca de exposición que comprende una pluralidad de miembros de biblioteca que exponen antiligandos.

22. Un método como se reivindica en la Reivindicación 21 en el que la biblioteca es una biblioteca de exposición de fases.

ES 2 314 280 T3

23. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que el ligando es al menos uno de entre antígenos, ligandos receptores; y objetivos de enzimas, que comprenden al menos uno de entre carbohidrato; proteína; péptido; lípido; polinucleótido; moléculas inorgánicas y moléculas conjugadas.

5 24. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que la biblioteca antiligando se construye a partir de al menos uno de entre anticuerpos, y variantes enlazadoras de antígenos, derivados o fragmentos de éstos; moléculas andamiaje con superficies variables por bioingeniería; receptores; y enzimas.

10 25. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente que comprende un paso ulterior de exposición del ligando y sus medios de separación a un estímulo que influye en la expresión de ligandos objetivos sobre dichas construcciones de ligandos.

15 26. Un producto de programa informático, que comprende un medio informático de lectura que tiene adaptados medios de programa de codificación informática, que cuando dicho programa se carga en un ordenador, hace que el ordenador ejecute el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a la 25.

20 27. Un programa informático, que puede distribuirse mediante transmisión electrónica de datos, que comprende medios adaptados de programa de codificación informática, que cuando dicho programa se carga en un ordenador hace que el ordenador ejecute el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a la 25.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

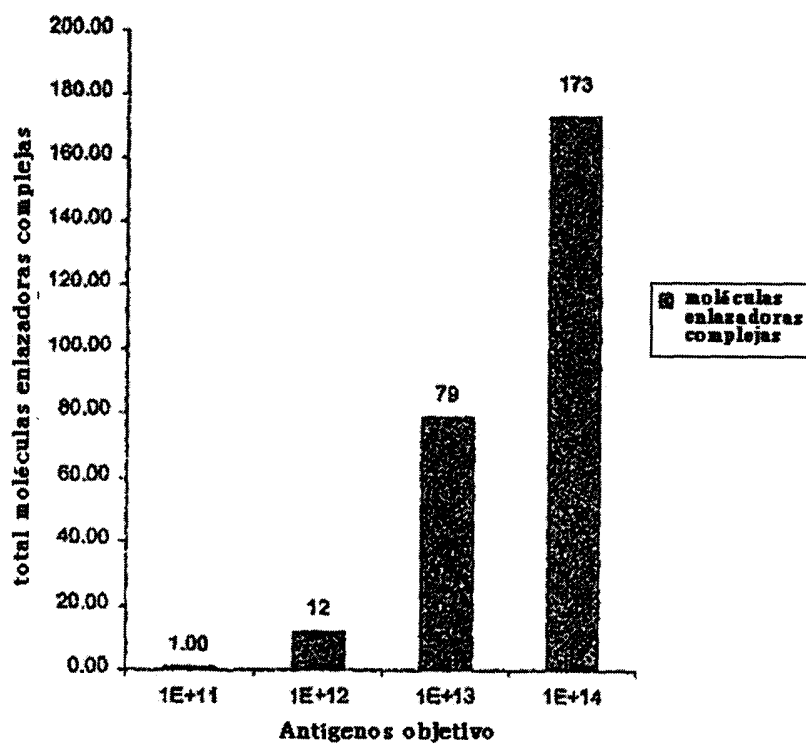


Figura 2

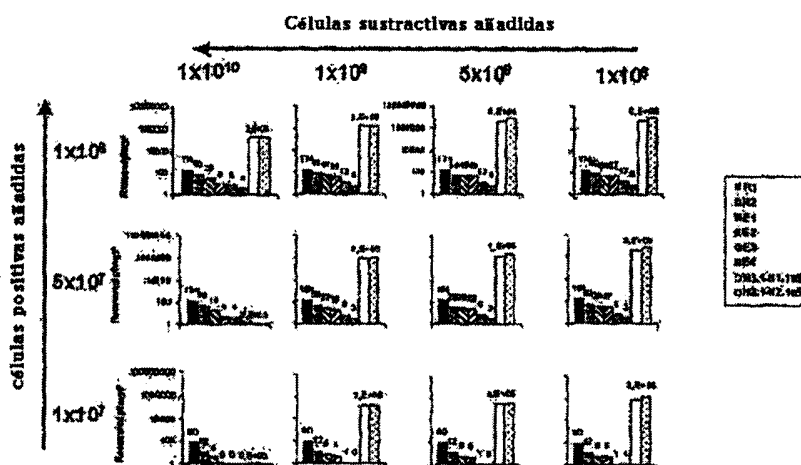


Figura 3

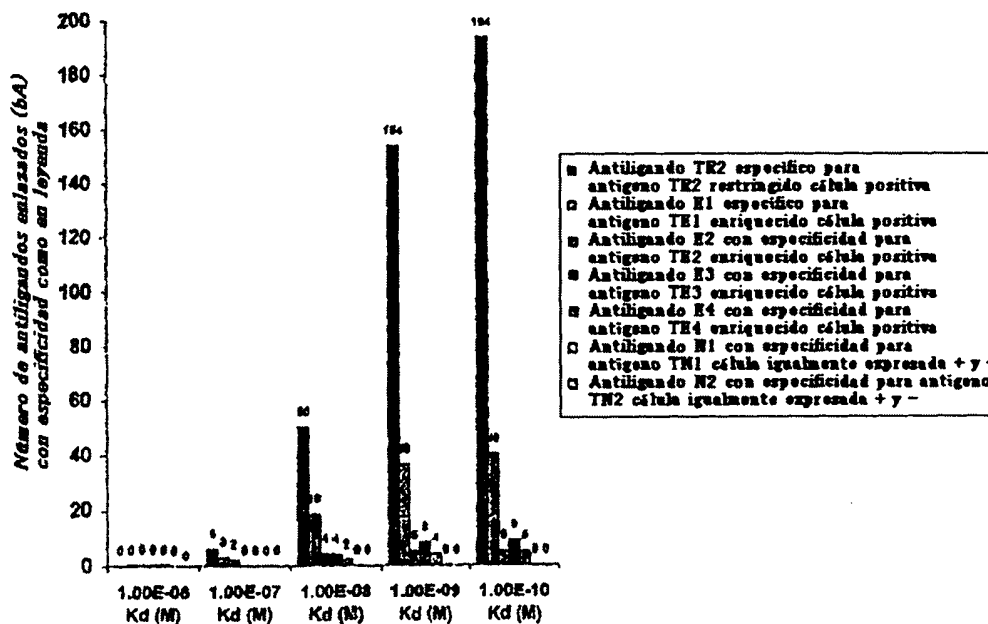


Figura 4

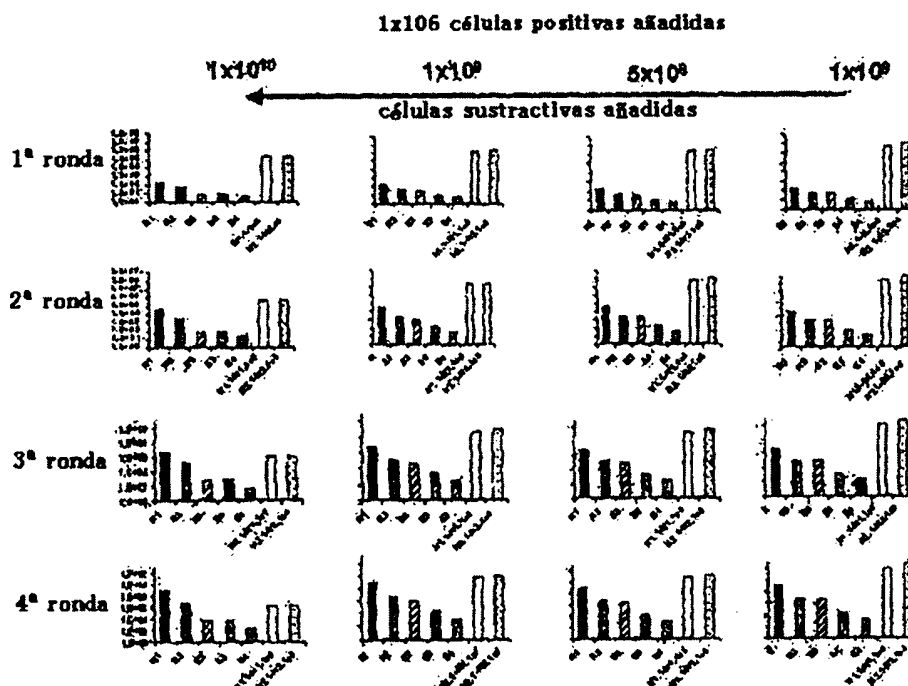


Figura 5

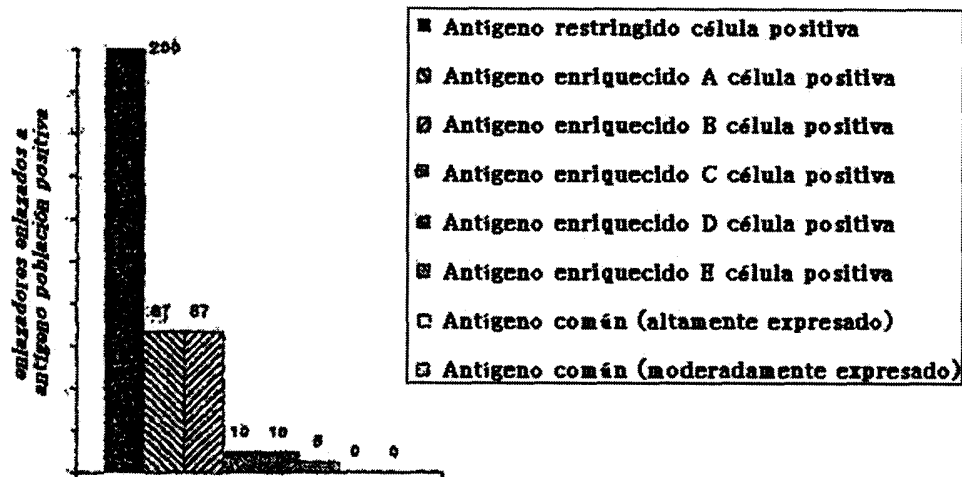


Figura 6

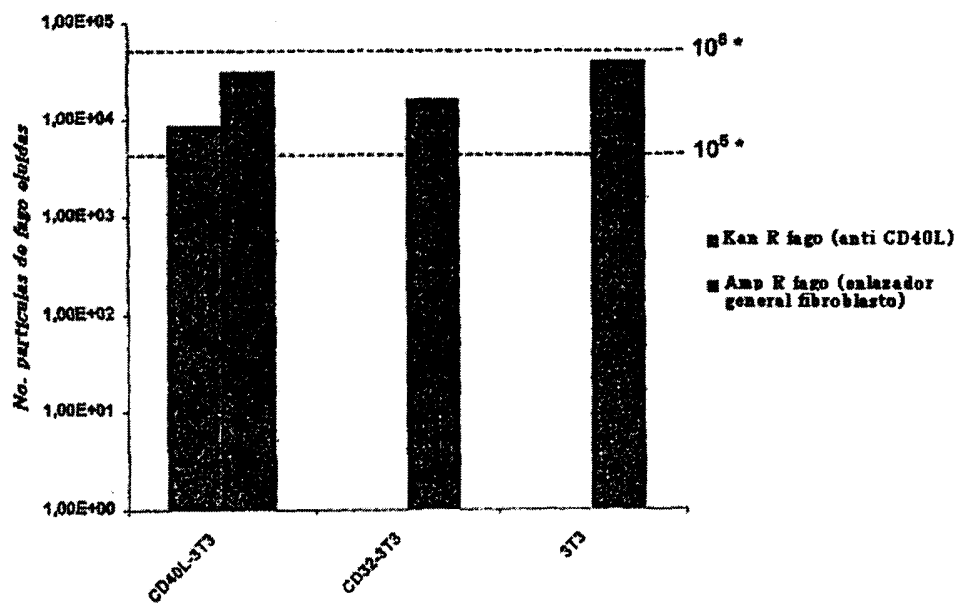


Figura 7A

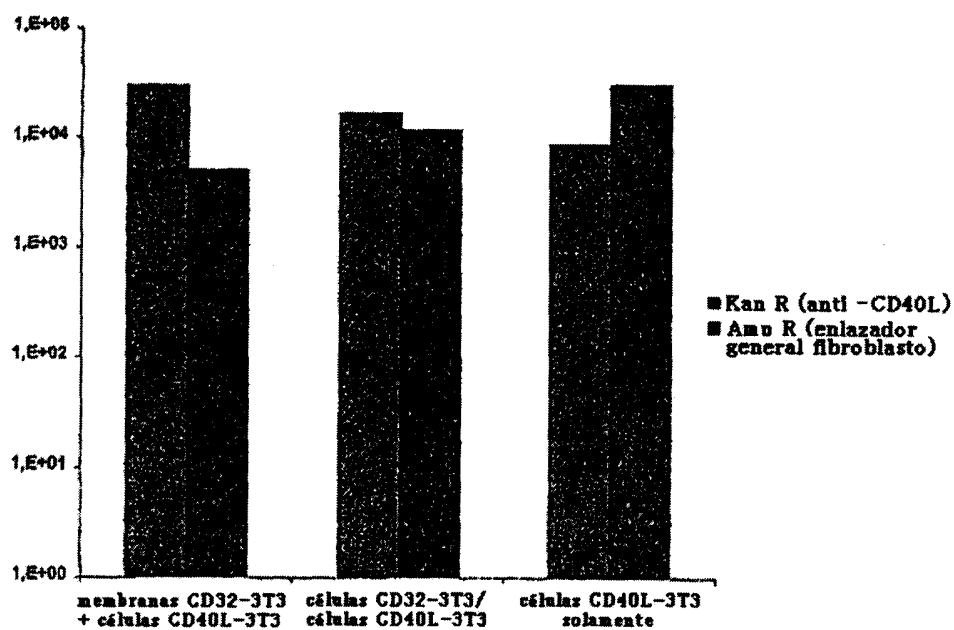


Figura 7B

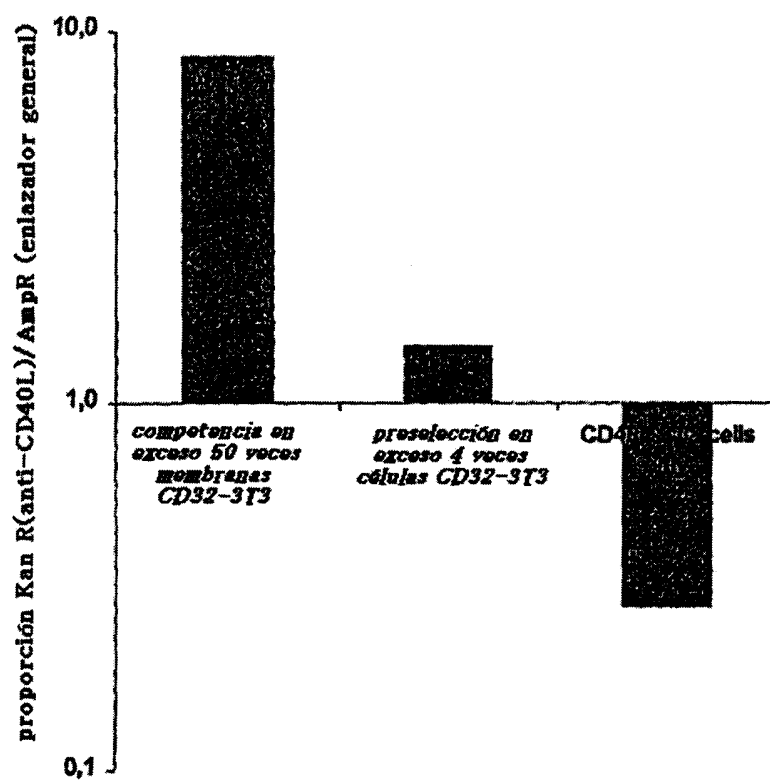


Figura 8A

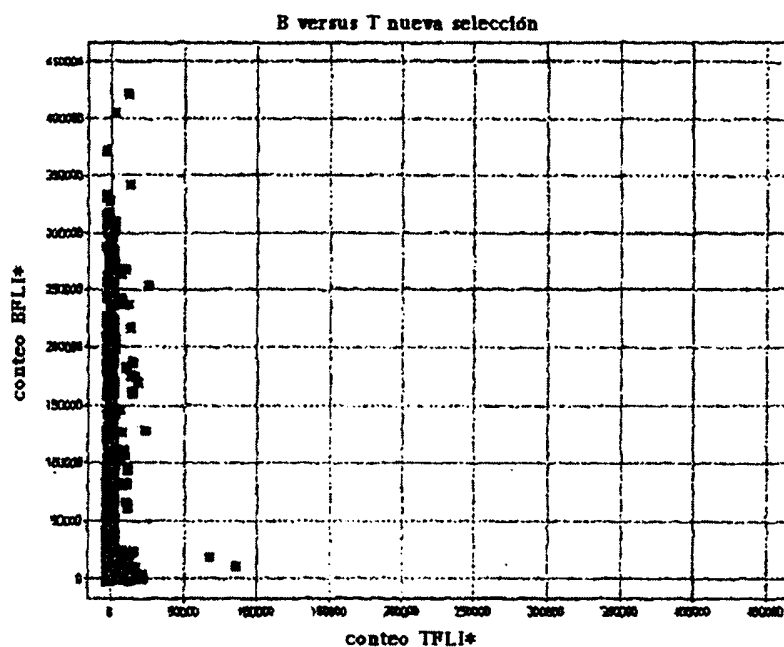


Figura 8B

