



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 343**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07857500 .8**

96 Fecha de presentación : **12.12.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2102338**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **Internalización.**

30 Prioridad: **12.12.2006 US 869652 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.12.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.12.2010**

73 Titular/es: **Morphosys AG.**  
**Lena-Christ-Strasse 48**  
**82152 Martinsried/München, DE**

72 Inventor/es: **Enzelberger, Markus**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 348 343 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****ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Se han identificado nuevas dianas mediante análisis comparativos y estadísticos de pacientes sanos y enfermos, en particular mediante el análisis de tejidos y/o plasma  
5 procedente de sangre de dichos pacientes. Normalmente, el análisis comparativo puede realizarse sobre diferentes niveles, tales como sobre los niveles de ADN, ARN, proteínas y postraduccionales. Una técnica usada comúnmente se basa en el análisis de la expresión diferencial de genes. En resumen, se marca ARNm procedente de células enfermas y sanas y posteriormente se hibrida con un chip de genes y se cuantifica. La regulación positiva o  
10 negativa de diferentes ARNm, basada en las señales de cuantificación, revela nuevas dianas potenciales. Otra estrategia bien conocida en la técnica anterior se basa en la identificación y comparación de patrones de metilación de ADN de moléculas de ADN procedentes de pacientes sanos y enfermos.

Sin embargo, en el contexto anterior debe entenderse que ni la modificación de ADN  
15 (es decir, el patrón de metilación de ADN) ni el análisis de expresión diferencial de genes (es decir el nivel de ARNm expresado en una célula) necesariamente refleja si una proteína específica codificada por el ADN correspondiente o el ARNm correspondiente efectivamente se expresa. Por lo tanto, sigue siendo un desafío la identificación de niveles de expresión diferencial, es decir, el análisis cuantitativo y también cualitativo de patrones de expresión de  
20 proteínas de células sanas en comparación con células enfermas.

Un procedimiento para la identificación de niveles de expresión diferencial de proteínas se basa en el análisis diferencial en gel bidimensional de dichas proteínas con el análisis posterior por espectrometría de masas, una técnica bien conocida para el experto en la materia. Además, son bien conocidos para un experto en la materia procedimientos basados  
25 en la fraccionación de proteínas tales como, mencionando sólo algunos, técnicas basadas en el uso de chips de proteínas y técnicas relacionadas con HPLC y FPLC.

Las técnicas de presentación en fagos ofrecen, por ejemplo, la posibilidad de reducir una biblioteca grande, por ejemplo, una biblioteca de expresión de miembros de unión, en muestras, tales como tejidos o células que, por ejemplo, proceden de un donante sano, y usar  
30 la población residual de la biblioteca en muestras, tales como tejidos o células, que proceden, por ejemplo, de un donante enfermo. Los miembros de unión que se han rastreado mediante el análisis de reducción, es decir, que se unen a dianas (poli)peptídicas u homólogos de tejidos/células enfermas pero no de tejidos/células sanas, normalmente se considera que se unen a una diana que se expresa de forma única (o al menos en un nivel mucho mayor) en las  
35 células diana (por ejemplo, la célula enferma). Posteriormente, pueden identificarse complejos

de miembro de unión/diana (poli)peptídica, por ejemplo, por espectrometría de masas o procedimientos para el análisis de proteínas bien conocidos para el experto en la materia.

Son de un interés particular miembros de unión que se internalizan tras la unión a su diana. Dichos miembros de unión de internalización se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 99/55367 o Biochimica et Biophysica Acta 1591 (2002) 109-118). Sin embargo, dichos miembros de unión se descubrieron por procedimientos diferentes de los procedimientos superiores descritos por la presente invención. Un experto en la materia sabe que dichos miembros de unión pueden, por ejemplo, fusionarse a cualquier sustancia o cualquier molécula pequeña que podría ser tóxica para la célula, desencadenando de esta manera la destrucción de la célula, preferentemente enferma, que expresa dicha o dichas dianas, siendo preferentemente dicha célula una célula enferma. Como también es conocido en la técnica, una vez que una diana de interés que se internaliza se ha identificado como, por ejemplo, una célula enferma o cancerosa, es posible determinar miembros de unión adicionales con, por ejemplo, mayor afinidad por la diana y/o mayor potencial para desencadenar la internalización de dicha diana. Dichos miembros de unión mejorados entonces pueden considerarse, por ejemplo, fármacos para tratar, por ejemplo, células enfermas que expresan dicha o dichas dianas.

Para determinar eficazmente las dianas potenciales que se han internalizado en la célula tras la unión de su miembro de unión respectivo, sería deseable separar los complejos internalizados de los complejos no internalizados. Sin embargo, en la técnica anterior, dicha separación no se ha conseguido de una manera satisfactoria cualitativa y cuantitativa confrontando de esta manera al experto en la materia con técnicas que requieren mucho tiempo y complejas para determinar miembros de unión y dianas que se internalizan.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar adicionalmente y también mejorar procedimientos y procesos que permitan una separación eficaz entre complejos internalizados y no internalizados.

La presente invención satisface esta necesidad presentando miembros de unión como polipéptidos que no son de fusión sobre proteínas de la cubierta de fagos bacterianos. Esto puede conseguirse por diversos sistemas de presentación, por ejemplo, los desvelados en el documento WO 01/05950.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 muestra la eficacia de la internalización de dianas tras la unión a Fab.

Se calculó el porcentaje (%) de internalización a partir de la relación de señal extracelular en la superficie celular a 4°C frente a 37°C; la recuperación de la fluorescencia se midió mediante la relación de tinción extracelular más intracelular a 4°C frente a 37°C,

mostrando que no se perdía ninguna o sólo se perdían unas pocas partículas de fago durante el proceso de internalización, el tratamiento con saporina y/o la tinción. Fab A mostró una internalización del 80%, Fab B sólo se internalizó con un 20% y Fab C no mostró ninguna unión en absoluto.

5 La Figura 2 muestra la eficacia de la internalización de complejos de fago y diana y la reducción del fago unido a la superficie por DDT.

Se muestra la internalización de fagos que presentan a través de un enlace disulfuro Fab A contra un antígeno que predominantemente se internaliza frente a fagos que presentan a través de un enlace disulfuro un Fab B contra un antígeno que predominantemente no se internaliza.

10 El porcentaje (%) de internalización se calculó a partir de la relación de señal extracelular sobre la superficie celular a 4°C frente a 37°C; la recuperación de la fluorescencia se midió mediante la relación de tinción extracelular más intracelular a 4°C frente a 37°C.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

15 La presente invención se refiere, en un aspecto, a un procedimiento para recuperar una molécula de ácido nucleico que codifica un miembro de unión de un complejo internalizado en una célula, que comprende las siguientes etapas de (a) poner en contacto una célula con una colección diversa de partículas de bacteriófago, en la que cada una o sustancialmente todas dichas partículas de bacteriófago presentan un miembro de unión en su superficie, en la que dicho miembro de unión se presenta como un (poli) péptido que no es de fusión con una proteína de cubierta de fago de dicha partícula de bacteriófago y en la que cada una o sustancialmente todas dichas partículas de bacteriófago comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica el miembro de unión presentado, (b) permitir la unión del miembro de unión presentado sobre la partícula de bacteriófago a su diana, permitiendo de esta manera la formación de al menos un complejo, comprendiendo cada uno de dichos complejos una partícula de bacteriófago con su miembro de unión presentado y su diana, (c) cultivar la célula en condiciones que permitan la internalización de al menos uno de dichos complejos en la célula, (d) eluir las moléculas de ácido nucleico que codifican un miembro de unión que no se internaliza en condiciones en las que sustancialmente no se produce lisis celular, (e) lisar la célula que comprende los complejos internalizados y (f) recuperar a partir de la célula lisada la molécula de ácido nucleico que codifica un miembro de unión derivado de al menos uno de los complejos internalizados.

25 El término "célula" se refiere a cualquier célula eucariota o procariota. En relación con la presente invención se prefieren las células de mamífero. Las células de mamífero pueden comprender células sanas y también células enfermas.

35

En el contexto de la presente invención, la expresión “colección diversa” se refiere a una colección de al menos dos partículas o moléculas que difieren en al menos parte de sus composiciones, propiedades y/o secuencias.

5 La expresión “una colección diversa de partículas de bacteriófago”, como se usa en relación con la presente invención, se refiere a una pluralidad de partículas de bacteriófago. Cada uno o sustancialmente todos los miembros de dicha pluralidad presentan un miembro de unión distinto. Los procedimientos para la generación de colecciones diversas de partículas de bacteriófagos son bien conocidos para un experto en la materia.

10 El término “bacteriófago”, como se usa en relación con la presente invención, debe considerarse en su sentido más amplio. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término “bacteriófago” se refiere a cualquier virus bacteriano que forma un empaquetamiento que tiene una cubierta de proteína que contiene el ácido nucleico requerido para la replicación del fago. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, mono- o bicatenario, lineal o circular. Son bien conocidos para el experto de experiencia habitual en la materia bacteriófagos tales como el fago lambda o fagos filamentosos (tales como M13, fd o f1).

15 En el contexto de la presente invención se prefiere un bacteriófago filamentoso tal como, por ejemplo, el bacteriófago M13. Es más preferido el bacteriófago filamentoso VCSM 13.

20 En el contexto de la presente invención, la expresión “partículas de bacteriófago” se refiere a las partículas de acuerdo con la presente invención, es decir partículas que presentan un (poli)péptido/proteína.

25 En el contexto anterior, debe considerarse que cada uno o sustancialmente todos los miembros de la colección diversa de partículas de bacteriófagos presentan un miembro de unión, en el que cada miembro de unión preferentemente difiere en al menos una posición de aminoácidos de su secuencia.

30 La expresión “miembro de unión” de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier (poli)péptido que puede unirse a un homólogo o diana específica, formando de esta manera un complejo. Se considera que dicha expresión, en relación con la presente invención, comprende, entre otras cosas, cualquier armazón conocido para un experto en la materia. Un “armazón” en relación con la presente invención se refiere a cualquier colección de (poli)péptidos que tienen una región flanqueante común y al menos una región variable. Los armazones conocidos para el experto en la materia son, por ejemplo, armazones basados en fibronectina o armazones basados en proteína con repetición de anquirina. El término “(poli)péptido”, como se usa en el presente documento, describe un grupo de moléculas que comprenden el grupo de péptidos, así como el grupo de polipéptidos. El grupo de péptidos

35

consiste en moléculas con hasta 30 aminoácidos, el grupo de polipéptidos o proteínas consiste en moléculas con más de 30 aminoácidos. Se considera que el término “(poli)péptido” en relación con la presente invención también comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o derivado del mismo. Debe considerarse que dicho anticuerpo comprende cualquier inmunoglobulina conocida para el experto en la materia. Una “inmunoglobulina” (Ig) es una proteína que pertenece a la clase de IgG, IgM, IgE, IgA o IgD (o cualquier subclase de las mismas), e incluye todos los anticuerpos conocidos convencionalmente y fragmentos funcionales de los mismos. Un “fragmento funcional” de un anticuerpo/inmunoglobulina en el presente documento se define como un fragmento de un anticuerpo/inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de una IgG) que conserva la región de unión a antígeno. La expresión “fragmento de anticuerpo o derivado del mismo” se refiere a anticuerpos monocatenarios, o fragmentos de los mismos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpos tales como Fab, un F(ab2)', Fv o fragmentos scFv, anticuerpos de un solo dominio etc., o un derivado modificado químicamente de cualquiera de éstos. Los anticuerpos a emplear de acuerdo con la invención o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes pueden modificarse adicionalmente fuera de los motivos usando técnicas convencionales conocidas en este campo, por ejemplo, usando una o más delecciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones de aminoácidos y/o cualquier otra modificación (por ejemplo, modificaciones postraduccionales y químicas, tales como glicosilación y fosforilación) conocidas en la técnica, solas o en combinación. Los procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN que corresponde a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidas para el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook y col.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición 1989 y 3ª edición 2001.

Los fragmentos o derivados de las moléculas de anticuerpo mencionadas definen (poli)péptidos que forman parte de las moléculas de anticuerpo anteriores y/o que se modifican por procedimientos químicos/bioquímicos o de biología molecular. Esto mismo se aplica, cambiando lo que haya que cambiar, a cualquier armazón. En la técnica se conocen procedimientos correspondientes y se describen, entre otros, en manuales de laboratorio (véase Sambrook y col., loc cit.; Gerhardt y col.; *Methods for General and Molecular Bacteriology*; ASM Press, 1994; Lefkovits; *Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*; Academic Press, 1997; Golemis; *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002). La expresión “se presenta como un (poli)péptido que no es de fusión”, en el contexto de la presente invención, se refiere a cualquier (poli)péptido que no se presenta por medio de ninguna de las técnicas de

fusión convencionales conocidas para un experto en la materia. La presentación convencional puede conseguirse, por ejemplo, por fusión genética en la que se produce una proteína de fusión como producto de expresión a partir de la fusión de preferentemente dos genes. Un experto en la materia sabe que dicha proteína de fusión de la técnica anterior algunas veces se denomina híbrido o proteína quimérica, que se crea por la expresión de un gen híbrido obtenido por ingeniería genética y en el que preferentemente se combinan dos secuencias génicas distintas.

Se considera que la expresión “proteína de cubierta de fago”, en relación con la presente invención, comprende no sólo proteínas de la cubierta de fagos procedentes de cualquier fago bien conocido para el experto en la materia, sino también fragmentos procedentes de los mismos, pudiendo incorporarse dichos fragmentos en la cubierta de proteína de la partícula de bacteriófago.

El término “diana”, como se usa en relación con la presente invención, se refiere a (i) cualquier (poli) péptido expresado en una célula que puede unirse a un miembro de unión o (ii) cualquier molécula capaz de internalizarse en una célula, y que puede unirse a un miembro de unión. Se prefiere cualquier receptor de la superficie celular, siendo más preferidas tirosina quinasas asociadas a receptores. Las dianas comprenden cualquier diana no conocida por un experto en la materia y que aún no se ha identificado, o podría conocerse per se pero no en el contexto de su capacidad de internalización. Una célula que expresa al menos una de las dianas potenciales también se denomina en relación con la presente invención “célula diana”.

La expresión “que permite la internalización de al menos uno de dichos complejos en la célula” se refiere a cualquier técnica bien conocida para un experto en la materia para desencadenar la internalización del complejo en la célula. Se prefieren técnicas que se basan en cambios de temperatura, tales como, por ejemplo, aumento de la temperatura de 4°C a 37°C.

La expresión “sustancialmente sin lisis celular” en la expresión “eluir las moléculas de ácido nucleico que codifican un miembro de unión que no se internaliza en condiciones en las que sustancialmente no se produce lisis celular”, como se usa en relación con la presente invención, debe interpretarse en el sentido de que no se lisa más de aproximadamente un 50%, preferentemente aproximadamente un 40%, más preferentemente aproximadamente un 30%, más preferentemente aproximadamente un 20%, preferentemente no más de aproximadamente un 10%, más preferentemente no más de aproximadamente un 5%, incluso más preferentemente no más de aproximadamente un 1% de las células, y aún más preferentemente no se lisa ninguna de las células.

La expresión “que lisa la célula que comprende el complejo internalizado”, como se usa

en relación con la presente invención, comprende cualquier técnica para lisar células conocida para un experto en la materia. Por lo que respecta a las células de mamífero, se prefiere la lisis debida a la presencia de trietilamina.

5 Como se ha perfilado anteriormente y en otros términos, la invención soluciona el problema técnico mencionado proporcionando un procedimiento que permite de forma fiable y eficaz al experto en la materia distinguir entre complejos internalizados y no internalizados. Con las técnicas de presentación basadas en proteínas de fusión, la separación de complejos internalizados y no internalizados normalmente sólo puede conseguirse aplicando etapas de elución bastante rigurosas con tampones apropiados, tal como mediante el uso de gradientes  
10 de pH o de sales, para reducir también los miembros de unión de alta afinidad. Se producen acontecimientos de lisis celular impredecibles, que conducen a una mezcla de complejos internalizados y no internalizados que complican o incluso impiden cualquier análisis adicional. La presente invención soluciona la situación anterior transfiriendo las ventajas de los sistemas de presentación sin fusión, tales como, por ejemplo, condiciones de elución suaves e  
15 independencia de la afinidad específica entre el miembro de unión y la diana, al campo de internalización de complejos.

En una realización preferida, un procedimiento de la presente invención comprende además la etapa de determinar la secuencia de la diana del complejo internalizado. El experto en la materia conoce técnicas para determinar la secuencia de dianas de complejos  
20 internalizados. Preferentemente, se contemplan técnicas para determinar la secuencia de aminoácidos de una diana (poli)peptídica. También se hace referencia a las realizaciones presentadas adicionalmente más adelante.

En otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, dicha presentación como (poli)peptido que no es de fusión se caracteriza por un enlace no peptídico  
25 entre la proteína de cubierta de fago y el miembro de unión.

En una realización más preferida del procedimiento de la presente invención, dicho enlace no peptídico es un enlace disulfuro.

En una realización aún más preferida de la presente invención, dicho enlace disulfuro se genera entre un primer resto de cisteína comprendido en dicha proteína de cubierta de fago  
30 y un segundo resto de cisteína comprendido en dicho miembro de unión.

En otra realización más preferida del procedimiento de la presente invención, dicha elución de dichas moléculas de ácido nucleico que codifican un miembro de unión que no se internalizan se realiza en condiciones reductoras de tal forma que se escinda dicho enlace  
disulfuro.

35 Esta y la realización previa se refieren a una situación en la que el enlace disulfuro es

responsable de la unión. En la solicitud de patente WO 01/05950 se desvelan detalles del sistema anterior.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, dicha recuperación a partir de la célula lisada de dicha molécula de ácido nucleico que codifica el miembro de unión se consigue por PCR. En el contexto de esta realización preferida, pueden usarse, por ejemplo, cebadores de PCR que son capaces de amplificar un miembro de unión de interés. Las técnicas basadas en cebadores específicos para la amplificación de moléculas de ácido nucleico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son bien conocidas para el experto en la materia.

En otra realización del procedimiento de la presente invención, dicha etapa para determinar la secuencia de la diana en el complejo internalizado se consigue por espectrometría de masas.

El experto en la materia conoce técnicas para recuperar moléculas de ácido nucleico a partir de células lisadas y técnicas para determinar la secuencia de un (poli)péptido en un complejo.

El procedimiento de la presente invención permite la identificación de una diana y/o un miembro de unión de la presente invención.

Los miembros de unión identificados por los procedimientos de la presente invención pueden usarse para administrar una sustancia tóxica a una célula.

Como se ha mencionado anteriormente y en otras palabras, la presente invención puede usarse para identificar miembros de unión y/o dianas que tienen la posibilidad de internalizarse en células. Preferentemente, como se ha explicado anteriormente, dichos miembros de unión y/o dianas pueden aplicarse en relación, por ejemplo, con la destrucción de células enfermas, tales como células cancerosas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención y no deben considerarse limitantes de la misma.

## **EJEMPLOS**

### Ejemplo 1:

Procedimiento experimental para el uso del procedimiento de la presente invención para identificar dianas de internalización.

#### Preparación de Diana y Células de Control

1. Lavar las células diana (transfectadas o positivas para antígeno) y células de control (transfectadas de forma simulada o negativas para antígeno) 3 veces con FCS<sup>1</sup> al 5%/PBS<sup>2</sup> o con PBS si las células se van a fijar (véase 2.2.3). Debe usarse TBS o HBS si tiene que añadirse Ca<sup>2+</sup> a todos los tampones (véase la sección 1.3: precipitados de

calcio en presencia de fosfato como fosfato cálcico).

2. Contar las células diana y ajustar a  $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  células en 1 ml de FCS al 5%/PBS en un tubo de microcentrífuga de 2 ml para cada selección.

5 3. Mantener todas las etapas posteriores a la temperatura apropiada de 4°C en hielo durante 2 horas en un rotador superior a 4°C para el bloqueo.

<sup>1</sup> FCS: Suero bovino fetal: filtrado estéril a 0,1 µm, ensayado en micoplasma. PAN Biotech GmbH, Aidenbach, nº 3302-P97160. (O FCS ensayado en micoplasma de cualquier otro proveedor).

10 <sup>2</sup> PBS de Dulbecco; sin calcio y magnesio y sin bicarbonato sódico, Gibco BRL Life Technologies, nº 14190-094.

4. Ajustar el título de fago del fago de la biblioteca combinada a  $1-2 \times 10^{13}$  fagos en 1 ml de FCS al 5%/PBS (+supl.). Incubar durante 2 horas a 4°C en un rotador superior para bloquear el fago.

#### Selección en Células Diana

15 5. Las células diana bloqueadas se centrifugan a 2000 rpm durante 2 minutos y se resuspenden en 0,5 - 1 ml de solución de fago pre-adsorbida.

6. Incubar durante 2 horas a 4°C en un balancín.

7. Centrifugar las células a 2000 rpm durante 2 minutos.

8. Extraer cuidadosamente mediante una pipeta el sobrenadante y desechar.

20 9. *Primer Lavado*: resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1 ml de FCS al 5%/PBS (+supl.) usando una pipeta.

10. Incubar durante 5 minutos a 4°C.

11. Centrifugar las células a 2000 rpm durante 2 minutos.

12. Extraer cuidadosamente mediante una pipeta el sobrenadante y desechar.

25 13. *Segundo Lavado*: resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1 ml de FCS al 5%/PBS (+supl.) usando una pipeta.

14. Incubar durante 5 minutos a 4°C en caso de células vivas o a 20°C en caso de células fijadas en un balancín.

15. Centrifugar las células a 2000 rpm durante 2 minutos.

30 16. Extraer cuidadosamente mediante una pipeta el sobrenadante y desechar.

17. *Tercer Lavado*: resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1 ml de FCS al 5%/PBS (+supl.) usando una pipeta. Transferir las células a un nuevo tubo estéril de 2 ml que se ha bloqueado con FCS al 5%/PBS<sup>3</sup>.

35 18. Incubar durante 5 minutos a 4°C en caso de células vivas o a 20°C en caso de células fijadas en un balancín.

19. Centrifugar las células a 2000 rpm durante 2 minutos.

20. Retirar cuidadosamente mediante una pipeta el sobrenadante y desechar.

#### Internalización de fago:

5 21. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1 ml de FCS al 5%/PBS (+supl.) usando una pipeta.

22. Aumentar la temperatura a 37°C e incubar durante 30 min.

#### Reducción de fago no internalizado

10 23. Añadir 300 µl de DTT 20 mM en Tris/HCl 10 mM, pH 8,0<sup>4</sup> a las células e incubar durante 10 minutos a TA<sup>5</sup>, centrifugar a 2000 rpm durante 2 minutos, y desechar el sobrenadante.

<sup>3</sup> Esta etapa ayuda a evitar de nuevo el enriquecimiento del fago unido de forma no específica al tubo de selección.

<sup>4</sup> DTT 20 mM en Tris/HCl 10 mM, pH 8,0: la solución de DTT siempre debe almacenarse a -20°C. Evitar múltiples congelaciones y descongelaciones de la solución.

15 <sup>5</sup> En lugar de la elución de DTT, que se recomienda para la biblioteca HuCAL GOLD®, también pueden usarse procedimientos de elución convencionales (por ejemplo, véase Krebs y col., 2001)

24. *Cuarto Lavado*: resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1 ml de FCS al 5%/PBS (+supl.) usando una pipeta.

20 25. Incubar durante 5 minutos a 4°C.

26. Centrifugar las células a 2000 rpm durante 2 minutos.

27. Retirar cuidadosamente mediante una pipeta el sobrenadante y desechar.

28. *Quinto Lavado*: resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1 ml de FCS al 5%/PBS (+supl.) usando una pipeta.

25 29. Incubar durante 5 minutos a 4°C en caso de células vivas o a 20°C en caso de células fijadas en un balancín.

30. Centrifugar las células a 2000 rpm durante 2 minutos.

31. Retirar cuidadosamente mediante una pipeta el sobrenadante y desechar.

#### Recuperación del fago internalizado

30 32. Añadir 500 µl de trietilamina 00 mM (140 µl de TEA en 10 ml de PBS) e incubar durante 10 minutos en TA (las células tienden a lisarse inmediatamente). Añadir 400 µl de Tris 1 mM pH 7,0 para la neutralización. Comprobar el pH después de la neutralización con una tira indicadora del pH.

33. Usar eluato para la infección de TG1 (DWCP).

35 34. Identificar y expresar los clones que expresan Fab por procedimientos

convencionales.

Ejemplo 2:

Se ensayaron antígenos A, B y C con respecto a la prevalencia en células y se ensayaron Fab A, B, C con respecto a las propiedades de internalización.

5 Materiales y Procedimientos:

Fab ensayados:

- Fab\_C\_FH (Agente de unión a lisozima, control negativo)
- Fab\_B\_FS (Agente de unión a ICAM, control de no internalización)
- Fab\_A\_FH (antígeno A, internalización)

10 - Fab ensayado a 1 µg/ml

Células:

- NCI H226: células de carcinoma de pulmón
- 1x10E5 células/medición

Otro Material:

- 15 - Saponina al 10%: se disolvió 1 g de Saponina en 10 ml de PBS, Saponina al 0,5%/PBS, y se almacenó a 4°C
- PFA al 4%: se diluyó solución madre al 16% 1:4 en PBS. Solución madre: Alpha Aesar al 16% p/v, Lote E105015
- tampón de FACS (FB): PBS/FCS al 3%, almacenado a 4°C
- 20 - IgG de cabra anti-humana (H+L)-PE, Jackson Dianova, 109-116-088, diluida 1:200 en tampón de FACS (PBS/FCS al 3%)

Procedimiento:

- 25 1. Se añadieron 100 µl de Fab (1 µg/ml) a un sedimento de  $2,5 \cdot 10^6$  células NCI H226 en tampón de FACS y se incubaron durante una hora en hielo. Las células se lavaron 2 veces usando 200 µl de tampón de FACS, se centrifugaron (2000 rpm) y se resuspendieron en 200 µl de medio.
- 2. Se transfirieron 100 µl a una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora a 4°C y adicionalmente 10 minutos en hielo.
- 3. Las células se lavaron 2 veces con 200 µl de tampón de FACS; 200 rpm
- 30 4. Se resuspendieron en 200 µl de tampón de FACS, se dividieron en 2 partes de 100 µl y se centrifugaron 2 minutos a 1200 rpm.

Para las condiciones de no internalización(4°C):

Para la tinción extracelular:

- 35 5. Las células se resuspendieron con 100 µl de IgG de cabra anti-humana-PE y se incubaron durante 1 hora a 4°C y se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de FACS;

200 rpm

6. Se resuspendieron en 100 µl de tampón de FACS

7. Después se midió la FACS en BD FACSARRAY FSC 50; SSC; 280; Yellow 420

Para la tinción intracelular:

5 8. Se resuspendieron células de la etapa (4) en 100 µl de PFA al 14%, 4°C 30 min

9. Las células se lavaron 2 veces con 200 µl de tampón de FACS; 2000 rpm

10. Las células se resuspendieron en Saporina al 0,5%, 10 minutos a TA

11. Se añadieron 100 µl de IgG anti-humana-PE y se incubaron durante 1 hora a TA

12. Las células se lavaron 2 veces con Saporina al 0,5%, 200 rpm

10 13. Se resuspendieron en 100 µl de tampón de FACS

14. Después se midió la FACS en BD FACSARRAY FSC 50; SSC; 280; Yellow 420

Para la condiciones de internalización (37°C):

Para la tinción extracelular:

15 15. Las células de la etapa (4) se resuspendieron con 100 µl de IgG de cabra anti-humana-PE y se incubaron durante 1 hora a 37°C y se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de FACS; 200 rpm

16. Se resuspendieron en 100 µl de tampón de FACS

17. Después se midió la FACS en BD FACSARRAY FSC 50; SSC; 280; Yellow 420

Para la tinción intracelular:

20 18. Se resuspendieron células de la etapa (4) en 100 µl de PFA al 14%, 4°C 30 min

19. Las células se lavaron 2 veces con 200 µl de tampón de FACS; 2000 rpm

20. Las células se resuspendieron en Saporina al 0,5%, 10 minutos a TA

21. Se añadieron 100 µl de IgG anti-humana-PE y se incubaron durante 1 hora a TA

22. Las células se lavaron 2 veces con Saporina al 0,5%, 200 rpm

25 23. Se resuspendieron en 100 µl de tampón de FACS

24. Después se midió la FACS en BD FACSARRAY FSC 50; SSC; 280; Yellow 420

Resultados:

30 Como se muestra en la Figura 1, se internalizó un 80% del complejo Fab-diana A en comparación con sólo un 20% del complejo Fab-diana B. El proceso de internalización, la permeabilización celular y la tinción no influyeron en el número global de fagos.

Ejemplo 3:

Enriquecimiento de fagos de internalización por escisión con DTT de fagos unidos extracelulares

Materiales y Procedimientos:

35 Fagos ensayados:

Se subclonaron genes que codificaban Fab A, B, C (véase el Ejemplo 1) en vector de presentación de Cys pMORPH23 y se produjeron fagos derivados de VCSM 13 de acuerdo con procedimientos convencionales.

- Fago\_Fab\_C (Agente de unión a lisozima, control negativo)
- 5 - Fago\_Fab\_B\_ (agente de unión a ICAM, control de no internalización)
- Fago\_Fab\_A\_ (antígeno A, internalización)
- se usaron  $1 \times 10^{10}$  fagos
- Eliminación:
- DTT 20 mM en Tris/HCl 10 nM pH 8,0, N° de Cat. de Roche 1583786
- 10 Anticuerpos:
- Mab anti-M13: Amersham Biosciences, 27-9420-01, 1 mg/ml, a diluir 1  $\mu$ g/ml en tampón de FACS FB (PBS/FCS al 3%)
- fragmento gamma de Fc de IgG de cabra anti-ratón específico-PE, Jackson Dianova, 115-116-071, R14, a diluir 1:200 en tampón de FACS (PBS/FCS al 3%)
- 15 Células:
- NCI H226: células de carcinoma de pulmón
- $1 \times 10^5$  células/medición
- Otro Material:
- Saponina al 10%: se disolvió 1 g de Saponina en 10 ml de PBS, Saponina al 0,5%/PBS, y se almacenó a 4°C
- 20 - PFA al 4%: se diluyó solución madre al 16% 1:4 en PBS. Solución madre: Alpha Aesar al 16% p/v, Lote E105015
- tampón de FACS (FB): PBS/FCS al 3%
- fragmento gamma de Fc de IgG de cabra anti-ratón específico-PE, Jackson Dianova,
- 25 115-116-071, R14, a diluir 1:200 en tampón de FACS (PBS/FCS al 3%)
- Procedimiento:
- 1. Se añadieron  $1 \times 10^{10}$  fagos a un sedimento de  $5 \times 10^4$  células NCI H226 en tampón de FACS y se incubaron durante una hora a 4°C. Las células se lavaron 2 veces usando 400  $\mu$ l de tampón de FACS, se centrifugaron (2000 rpm) y se resuspendieron en 600  $\mu$ l de medio.
- 30
- Para condiciones de no internalización (4°C):
- 2. Se transfirieron 2 x 100  $\mu$ l a una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora a 4°C y además durante 5 minutos en hielo
- 3. Las células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de tampón de FACS; 200 rpm
- 35 4. Se resuspendieron 200  $\mu$ l de tampón de FACS y se centrifugaron 2 minutos a 2000

rpm.

5. Una alícuota de control se resuspendió en 100  $\mu$ l, y la segunda en 50  $\mu$ l de DDT

6. Las células se almacenaron en hielo durante 5 minutos y se lavaron 2 veces usando 200  $\mu$ l de tampón de FACS y 1200 rpm

5 7. Las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de anticuerpo anti-M13 (5  $\mu$ g/ml de tampón de FACS)

8. Las células se incubaron durante 45 minutos a 4°C

9. Las células se lavaron dos veces en 200  $\mu$ l de tampón de FACS

10 10. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de fragmento gamma de Fc de IgG de cabra anti-ratón específico-PE (1:100)

11. Las células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de tampón de FACS

12. La FACS se midió en BD FACSARRAY FSC 10; SSC335; Yellow 330

Para las condiciones de internalización (37°C):

15 13. Se transfirieron 2 x 100  $\mu$ l a una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37°C y además durante 5 minutos en hielo

14. Las células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de tampón de FACS; 200 rpm

15. Se resuspendieron 200  $\mu$ l de tampón de FACS y se centrifugaron 2 minutos a 2000 rpm.

16. Una alícuota de control se resuspendió en 100  $\mu$ l, y la segunda en 50  $\mu$ l de DDT

20 17. Las células se almacenaron en hielo durante 5 minutos y se lavaron 2 veces usando 200  $\mu$ l de tampón de FACS y 1200 rpm

18. Las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de anticuerpo anti-M13 (5  $\mu$ g/ml de tampón de FACS)

19. Las células se incubaron durante 45 minutos a 4°C

25 20. Las células se lavaron dos veces en 200  $\mu$ l de tampón de FACS

21. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de fragmento gamma de Fc de IgG de cabra anti-ratón específico-PE (1:100)

22. Las células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de tampón de FACS

23. La FACS se midió en BD FACSARRAY FSC 10; SSC335; Yellow 330

30 Resultados:

En las condiciones del experimento (con/sin DTT, 4°C o 37°C), las células permanecieron intactas. Como era de esperar, no pudo detectarse la unión celular de fagos que llevaban Fab C.

35 Como se muestra en la Figura 2, aproximadamente un 65% del fago A y un 20% del fago B se internalizaron cuando se aumentó la temperatura de 4°C a 37°C.

Los fagos en la superficie celular pudieron eliminarse eficazmente mediante el tratamiento durante 5 minutos con DTT 20 mM a 4°C sin influir sobre la integridad celular.

La adición de DTT tras la internalización retiró los fagos unidos a la superficie mientras que dejaba intactos a los internalizados, permitiendo de esta manera un enriquecimiento de fagos que se unen a dianas de internalización.

5

**REIVINDICACIONES**

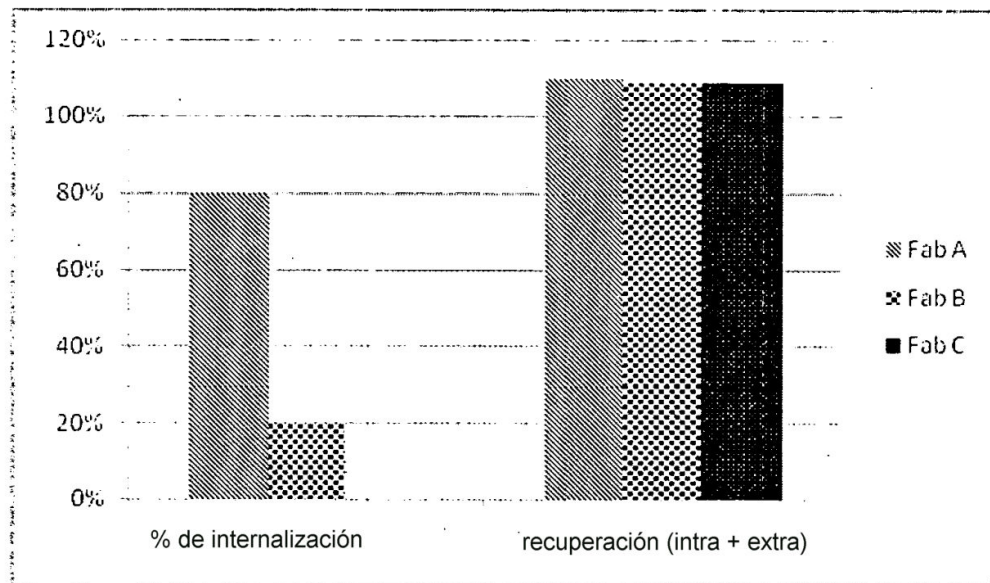
1. Un procedimiento para recuperar una molécula de ácido nucleico que codifica un miembro de unión de un complejo internalizado en una célula eucariota, que comprende las siguientes etapas de:
- 5
- (a) poner en contacto una célula eucariota con una colección diversa de partículas de bacteriófago, en la que cada una o sustancialmente todas dichas partículas de bacteriófago presentan un miembro de unión en su superficie, en la que dicho miembro de unión se presenta como un (poli) péptido que no es de fusión con una proteína de cubierta de fago de
- 10 dicha partícula de bacteriófago y en la que cada una o sustancialmente todas dichas partículas de bacteriófago comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica el miembro de unión presentado,
- (b) permitir la unión del miembro de unión presentado sobre la partícula de bacteriófago a su diana, permitiendo de esta manera la formación de al menos un complejo, comprendiendo
- 15 cada uno de dichos complejos una partícula de bacteriófago con su miembro de unión presentado y su diana,
- (c) cultivar la célula en condiciones que permitan la internalización de al menos uno de dichos complejos en la célula,
- (d) eluir las moléculas de ácido nucleico que codifican un miembro de unión que no se
- 20 internaliza en condiciones en las que sustancialmente no se produce lisis celular,
- (e) lisar la célula que comprende los complejos internalizados y
- (f) recuperar a partir de la célula lisada la molécula de ácido nucleico que codifica un miembro de unión derivado de al menos uno de los complejos internalizados.
- 25
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinar la secuencia de la diana del complejo internalizado.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha presentación como (poli) péptido de no fusión se **caracteriza por** un enlace no peptídico entre la proteína de cubierta de fago y
- 30 el miembro de unión.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho enlace no peptídico es un enlace disulfuro.
- 35
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho enlace disulfuro se genera entre

un primer resto de cisteína comprendido en dicha proteína de cubierta de fago y un segundo resto de cisteína comprendido en dicho miembro de unión.

- 5 6. El procedimiento de la reivindicación 4 ó 5, en el que dicha etapa de elución de dichas moléculas de ácido nucleico que codifican un miembro de unión que no se internaliza se realiza en condiciones reductoras de tal forma que se escinde dicho enlace disulfuro.
- 10 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha recuperación de la célula lisada de dicha molécula de ácido nucleico que codifica el miembro de unión se consigue por PCR.
8. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha etapa de determinación de la secuencia de la diana en el complejo internalizado se consigue por espectrometría de masas.

Figura 1

Eficacia de internalización de la diana tras la unión a Fab



**Figura 2**

Eficacia de internalización de complejo de fago y diana y reducción de fago unido a la superficie por DDT.

