

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 122**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
C40B 40/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 15/14 (2014.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2019 PCT/KR2019/005080**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2019 WO19209073**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2019 E 19792085 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3798305**

54 Título: **Método de bioselección basado en magnetismo a través de la unión de una perla magnética a una célula**

30 Prioridad:

27.04.2018 KR 20180049100

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2025

73 Titular/es:

**AIMED BIO INC. (100.00%)
 11th FL, MK bld, 67, Jeongui-ro Songpa-gu
 Seoul 05835, KR**

72 Inventor/es:

**NAM, DO-HYUN y
 MIN, BYEONGKWI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 3 013 122 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 bioselección basado en magnetismo a través de la unión de una perla magnética a una célula

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para cribar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, usando células que tienen perlas magnéticas adheridas a las mismas, y más específicamente, a un método para cribar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una proteína antigénica con un sistema basado en magnetismo usando células que contienen un complejo de fosfolípido/biotina/estreptavidina/perlas magnéticas en la superficie de las mismas y que sobreexpresan una proteína antigénica.

15 **Antecedentes de la técnica**

En 1975, la tecnología para desarrollar anticuerpos monoclonales comenzó con la tecnología de hibridoma. La tecnología de hibridoma es una tecnología para seleccionar anticuerpos monoclonales induciendo una respuesta inmunitaria en ratones y a continuación fusionando linfocitos B con células de mieloma y manteniendo un estado inmortal. Esta tecnología implica la obtención de un anticuerpo de ratón y, por lo tanto, tiene un efecto secundario en el sentido de que el anticuerpo de ratón es reconocido como un antígeno, cuando se aplica a seres humanos, lo que provoca una respuesta inmunitaria. Esto se denomina "HAMA" (respuesta de anticuerpos anti ratón humanos) (Tiandra J.J. *et al.*, Immunol. Cell Biol., Vol. 66, págs. 367-76, 1990).

Para superar los efectos secundarios, se desarrolló un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado aplicando una técnica que transforma los anticuerpos murinos, de forma similar a los anticuerpos humanos. Sin embargo, todavía existen problemas en cuanto a que se producen respuestas inmunitarias y el tiempo de desarrollo es considerablemente largo.

La tecnología de presentación en fagos para expresar proteínas o péptidos en las superficies de bacteriófagos se desarrolló en 1985. La presentación en fagos es un método para producir una biblioteca de fagos que tiene diversos fragmentos de anticuerpos y usar la biblioteca de fagos para la selección de anticuerpos, y los desarrolladores la usan continuamente debido a la rápida velocidad de selección y a la aplicación relativamente sencilla de la misma.

Los anticuerpos se seleccionan a través de un método de selección, recuperación y amplificación de fragmentos de anticuerpos específicos para un antígeno deseado usando la biblioteca de fagos, que se denomina "bioselección". Existen diversos métodos típicos de selección, incluyendo selección usando proteínas recombinantes, selección celular, selección basada en perlas magnéticas, selección *in vivo* y selección usando tejido (McGuire M.J. *et al.*, Method Mol. Biol., Vol. 504, págs. 291-321, 2009). Suharni, *et al.* (Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, Vol. 33, N.º 6 (01.12.2014), páginas 378-385) describen un método de selección basada en proteoliposomas para un fragmento de anticuerpo recombinante. En este método, los proteoliposomas biotinilados se usan como diana de unión para los anticuerpos y se inmovilizan sobre la superficie de microplacas acopladas a estreptavidina (o perlas paramagnéticas).

Generalmente se usa la selección con proteínas recombinantes, pero tiene la desventaja de tener una biblioteca de anticuerpos para un antígeno específico y requiere un antígeno purificado con alta pureza. Con la proteína purificada, es difícil realizar una modificación postraduccional (PTM, por sus siglas en inglés) de la proteína, por lo que incluso si se descubre un anticuerpo, puede que no funcione realmente *in vivo*.

Para superar esto, se desarrolló la selección celular, y se ha vuelto más fácil desarrollar anticuerpos que se unan a proteínas de membrana específicas (receptores acoplados a proteína G, canales iónicos activados por ligando, tirosina cinasas receptoras y receptores similares a inmunoglobulina). Este método usa una forma natural de células como antígenos y, por lo tanto, es capaz de seleccionar anticuerpos en una forma que realiza la estructura tridimensional y la PTM de la proteína.

Sin embargo, la selección celular requiere mucho trabajo y puede mostrar grandes diferencias entre los usuarios en los experimentos. Por lo tanto, existe la necesidad de una selección celular de próxima generación que sea capaz de resolver y superar estos problemas.

Hasta la fecha, se han desarrollado diversos anticuerpos de diagnóstico y terapéuticos a través de la presentación en fagos, y también se están desarrollando métodos de sistemas de cribado masivo de alta velocidad fusionados con un sistema automatizado para establecer un método de selección rápido y preciso.

Por consiguiente, como resultado de amplios esfuerzos para desarrollar un método para cribar anticuerpos a alta velocidad y gran volumen, los presentes inventores encontraron que los anticuerpos se pueden seleccionar a alta velocidad, sensibilidad y precisión reduciendo al mismo tiempo los efectos secundarios mediante el cribado de una biblioteca de anticuerpos usando un sistema basado en magnetismo y células que contienen perlas magnéticas y

proteínas antigénicas, completando de este modo la presente invención.

La información divulgada en esta sección de Antecedentes se proporciona únicamente para mejorar la comprensión de los antecedentes de la presente invención y, por lo tanto, puede no incluir información que forme parte de la técnica anterior que ya sea obvia para los expertos en la técnica.

Divulgación

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para cribar un anticuerpo usando un sistema basado en magnetismo y células que incluyen perlas magnéticas en la superficie de las mismas y que sobreexpresan una proteína antigénica.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los objetos anteriores y otros se pueden lograr mediante la provisión de un método para cribar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína antigénica, incluyendo el método: (i) preparar una célula que sobreexpresa una proteína antigénica, en donde un fosfolípido biotinilado se inserta en una membrana de la célula y el fosfolípido biotinilado se une a un complejo de estreptavidina/perlas magnéticas; (ii) tratar la célula con una biblioteca que incluye un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, y cribar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína antigénica usando un sistema basado en magnetismo; (iii) hacer reaccionar el anticuerpo cribado, o la biblioteca de fragmentos de unión a antígeno del mismo, con células que no expresan la proteína antigénica para seleccionar solo un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína antigénica; y (iv) separar y/o eliminar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un antígeno distinto de la proteína antigénica del anticuerpo seleccionado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se define en la reivindicación 1.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el principio de un método de acuerdo con la presente invención.

La figura 2A muestra la fórmula química de DHPE-FITC usada en una realización de la presente invención, la figura 2B es un diagrama esquemático del material, y la figura 2C es un diagrama esquemático que ilustra un proceso de separación de células de acuerdo con una realización de la presente invención a través de análisis FACS.

La figura 3A muestra la intensidad de fluorescencia en función del tiempo de reacción (30 min, 60 min) en una célula que contiene un material similar a la membrana celular de acuerdo con una realización de la presente invención, y la figura 3B muestra que la célula de la figura 3A contiene el material similar a la membrana celular incluso después de 6 horas.

La figura 4A muestra la fórmula química de B-X-DHPE usada en una realización de la presente invención, la figura 4B es un diagrama esquemático del material, y la figura 4C es un diagrama esquemático que ilustra un proceso de separación de células de acuerdo con una realización de la presente invención a través de análisis FACS.

La figura 5A muestra la eficiencia de unión en función de la concentración del material similar a la membrana celular en la célula que incluye el material similar a la membrana celular de acuerdo con una realización de la presente invención, y la figura 5B muestra la eficiencia de unión en función de la concentración y la temperatura de reacción.

La figura 6A muestra el nivel de expresión de proteína en la superficie de la membrana celular dependiendo de si el material similar a la membrana celular está fusionado o no, y la figura 6B es un diagrama esquemático que muestra el caso donde el material similar a la membrana celular está unido a la membrana celular.

La figura 7A es un diagrama esquemático que muestra un método para fusionar la célula con el complejo de fosfolípido/biotina/estreptavidina/perlas magnéticas de acuerdo con una realización de la presente invención, y la figura 7B muestra un resultado de observar la eficiencia de fusión de los dos métodos.

La figura 8 muestra un resultado de medir la tasa de adhesión de perlas magnéticas dependiendo de las condiciones del medio de cultivo de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 9 muestra un resultado de medir la eficiencia de formación de un complejo de fosfolípido/biotina/estreptavidina/perlas magnéticas de la célula de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 10 muestra un diagrama esquemático que ilustra un dispositivo de selección celular automatizado basado en magnetismo y una etapa de funcionamiento del mismo.

La figura 11 muestra una etapa de selección celular en un sistema automatizado usando perlas magnéticas de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 La figura 12 muestra un resultado de la comparación del número de células restantes después de la etapa final cuando se realiza una selección automática mediante la aplicación a un dispositivo basado en magnetismo después de la formación de un complejo de fosfolípido/biotina/estreptavidina/perlas magnéticas de la célula de acuerdo con una realización de la presente invención, con un método de selección manual.

10 La figura 13A muestra un resumen de los reactivos necesarios para la selección de células adheridas a perlas magnéticas usando un dispositivo basado en magnetismo, y la figura 13B muestra un resumen de un protocolo para la selección de células adheridas a perlas magnéticas usando un dispositivo basado en magnetismo (BindIt Software 3.3.1 para instrumentos KingFisher).

15 La figura 14A muestra resultados de la selección automática de células procedentes de un paciente que sobreexpresan un antígeno específico usando un dispositivo basado en magnetismo, en donde se usa el resultado de la bioselección a través de un método de inmovilización de antígeno, y el resultado se obtiene en condiciones de lavado fuerte y débil, y la figura 14B muestra resultados de la selección automática de células procedentes de un paciente que sobreexpresan un antígeno específico usando un dispositivo basado en magnetismo, en donde se usa el resultado de la bioselección a través de un antígeno adherido a perlas magnéticas y el resultado se obtiene en condiciones de lavado débil.

20 La figura 15A muestra resultados del cribado de anticuerpos basado en ELISA que tiene capacidad de unión específica a un determinado antígeno usando el resultado de la selección automática, en donde se usa el resultado de la bioselección a través de un método de inmovilización de antígeno, y el resultado se obtiene en condiciones de lavado fuerte y débil, y la figura 15B muestra los resultados del cribado de anticuerpos basado en ELISA que tiene capacidad de unión específica a un determinado antígeno usando el resultado de la selección automática, en donde se usa el resultado de la bioselección a través de un antígeno adherido a perlas magnéticas y el resultado se obtiene en condiciones de lavado débil.

30 La figura 16 es un gráfico que muestra los valores relativos para las proteínas recombinantes positivas/negativas como resultado de la comparación de los valores de ELISA de los anticuerpos seleccionados.

Mejor modo

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que apreciarán los expertos en el campo al que pertenece la presente invención. En general, la nomenclatura usada en el presente documento es bien conocida en la técnica y se usa habitualmente.

40 Los presentes inventores se han esforzado por superar el inconveniente de que los resultados de la selección celular difieren en gran medida entre los usuarios. Como resultado, los presentes inventores intentaron confirmar que, cuando se realiza la selección celular en un sistema basado en magnetismo usando células que contienen perlas magnéticas, se aumenta la eficiencia de la selección celular y es posible un cribado masivo a alta velocidad.

45 Además, los presentes inventores se esforzaron por desarrollar anticuerpos para el tratamiento contra el cáncer usando células procedentes de pacientes que tienen proteínas antigénicas con el fin de seleccionar anticuerpos que tengan una alta posibilidad de uso exitoso en futuros ensayos clínicos y que se internalicen y puedan actuar de manera eficaz dentro de las células. Como resultado, los presentes inventores han seleccionado anticuerpos que se unen a proteínas antigénicas con alta afinidad y se internalizan en las células usando tecnología de presentación en fagos, y confirmaron que estos anticuerpos se internalizan en las células.

50 Por consiguiente, en una realización de la presente invención, se realizó la selección celular usando células que contenían un fosfolípido unido a biotina en una membrana celular y que contenían un complejo de estreptavidina/perlas magnéticas en la superficie de la misma. Como resultado, fue posible cribar anticuerpos a alta velocidad (figura 12).

55 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para cribar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína antigénica, incluyendo el método: (i) preparar una célula que sobreexpresa una proteína antigénica, en donde un fosfolípido biotinilado se inserta en una membrana de la célula y el fosfolípido biotinilado se une a un complejo de estreptavidina/perlas magnéticas; (ii) tratar la célula con una biblioteca que incluye un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, y cribar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína antigénica usando un sistema basado en imán; (iii) hacer reaccionar el anticuerpo cribado, o la biblioteca de fragmentos de unión a antígeno del mismo, con células que no expresan la proteína antigénica para seleccionar así solo un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína antigénica; y (iv) separar y eliminar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un antígeno distinto de la proteína antigénica del anticuerpo seleccionado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se define en la reivindicación 1.

65

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgA, IgE, IgM, IgD, IgY e IgG, y puede unirse específicamente a un antígeno diana. Consiste en dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, y cada cadena incluye un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos variable y un dominio constante que tiene una secuencia de aminoácidos constante. Un sitio de unión a antígeno se encuentra en el extremo de la estructura tridimensional del dominio variable, y este sitio se forma combinando tres regiones determinantes de complementariedad presentes en cada una de las cadenas ligera y pesada. La región determinante de complementariedad es una parte que tiene una variabilidad particularmente alta en la secuencia de aminoácidos entre los dominios variables, y se pueden encontrar anticuerpos específicos para diversos antígenos debido a dicha alta variabilidad. El alcance de la presente invención incluye no sólo una forma completa de anticuerpo, sino también un fragmento de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término "ScFv" (Fv monocatenario, anticuerpo de fragmento monocatenario o fragmento de anticuerpo) se refiere a un anticuerpo en el que los dominios variables de las cadenas ligera y pesada están unidos. En algunos casos, ScFv puede incluir un enlazador (sitio de enlace) que consiste en una cadena peptídica que tiene aproximadamente 15 aminoácidos unidos, y en este caso, ScFv puede tener una estructura que incluye un dominio variable de cadena ligera, un sitio de enlace y un dominio variable de cadena pesada, o que incluye un dominio variable de cadena pesada, un sitio enlazado y un dominio variable de cadena ligera, y tiene una especificidad de antígeno igual o similar a la del anticuerpo original.

La expresión "anticuerpo completo" se refiere a una estructura que tiene dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, en donde cada cadena ligera está unida a una cadena pesada correspondiente mediante un enlace disulfuro. El dominio constante de cadena pesada tiene los tipos gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) y épsilon (ϵ), y se subclasifica en gamma 1 (γ 1), gamma 2 (γ 2), gamma 3 (γ 3), gamma 4 (γ 4), alfa 1 (α 1) y alfa 2 (α 2). El dominio constante de la cadena ligera tiene los tipos kappa (κ) y lambda (λ).

El fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se refiere a un fragmento que tiene capacidad de unión a antígeno, e incluye Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv y similares. Entre los fragmentos de anticuerpo, Fab se refiere a una estructura que incluye un dominio variable de cada una de las cadenas pesada y ligera, el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada, cada uno de los cuales tiene un sitio de unión a antígeno. Fab' se diferencia de Fab en que incluye además una región bisagra que incluye al menos un residuo de cisteína en el extremo C del dominio CH1 de la cadena pesada. F(ab')₂ se crea mediante un enlace disulfuro entre residuos de cisteína en la región bisagra de Fab'. Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que tiene solo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, y la tecnología recombinante para producir Fv se divulga en las Publicaciones Internacionales PCT tales como WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 y WO 88/09344. Un Fv bicatenario es un fragmento en donde el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están unidos por un enlace no covalente, y un Fv monocatenario (scFv) es un fragmento en donde el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están unidos generalmente por un enlace covalente a través de un enlazador peptídico entre los mismos, o están unidos directamente en el extremo C, formando una estructura con forma de dímero, como el Fv bicatenario. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse usando proteasas (por ejemplo, Fab se puede obtener mediante escisión por restricción de todo el anticuerpo con papaína, y el fragmento F(ab')₂ se puede obtener mediante escisión por restricción de todo el anticuerpo con pepsina), y puede prepararse usando técnicas de recombinación genética.

Como se usa en el presente documento, la expresión "biblioteca de anticuerpos (o ScFv)" se refiere a una colección de diversos genes de anticuerpos que tienen diferentes secuencias. Para separar los anticuerpos específicos para cualquier antígeno de la biblioteca de anticuerpos, se requiere una diversidad muy alta, y se construye y se usa una biblioteca que consiste en diferentes clones de anticuerpos. Los genes de anticuerpos que constituyen tal biblioteca de anticuerpos pueden clonarse, por ejemplo, en un vector fagémido y pueden transformarse en un transformante (*E. coli*).

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" puede usarse indistintamente con "gen" o "nucleótido", y puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en ADN natural/sintético, ADN genómico, ARN natural/sintético, ADNc y ARNc, pero sin limitación a los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término vector "fagémido" se refiere a un ADN plasmídico que se usa para la presentación en fagos y tiene un origen de replicación de fagos, y generalmente tiene un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección. El vector fagémido usado para la presentación en fagos incluye el gen gIII del fago M13 o una porción del mismo, y el gen ScFv está ligado al extremo 5' del gen gIII y se expresa a través de un transformante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fago auxiliar" se refiere a un fago que proporciona la información genética necesaria para que el fagémido se empaquete en partículas de fago. Dado que solo el gen gIII de los genes del fago o una porción del mismo está presente en el fagémido, las células hospedadoras (transformantes) transformadas con el fagémido se infectan con un fago auxiliar para suministrar de este modo los genes del fago restantes. Existen tipos tales como M13K07 o VCSM13, y la mayoría de ellos incluyen genes de resistencia a antibióticos tales como kanamicina, de modo que se pueden seleccionar los transformantes infectados con el fago

auxiliar. Además, debido a que la señal de empaquetamiento es defectuosa, los genes fagémidos se empaquetan selectivamente en partículas de fagos en lugar de en genes de fagos auxiliares.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia señal" se refiere a una secuencia de bases o una secuencia de aminoácidos correspondiente a la misma, que se encuentra en el extremo 5' de un gen y funciona como una señal necesaria cuando la proteína codificada a partir del gen se secreta al exterior.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "presentación en fagos" es una técnica para presentar un polipéptido mutante como una proteína de fusión con al menos una parte de una proteína de cubierta, por ejemplo, sobre la superficie de la partícula de un fago, por ejemplo, un fago fibroso. La utilidad de la presentación en fagos es clasificar de manera rápida y eficiente secuencias que se unen a antígenos diana con alta afinidad en grandes bibliotecas de mutantes proteicos aleatorizados. La presentación de péptidos y bibliotecas de proteínas en fagos se ha usado para cribar millones de polipéptidos con el fin de identificar polipéptidos con propiedades de unión específicas.

15 La tecnología de presentación en fagos ha ofrecido una herramienta poderosa para generar y cribar proteínas novedosas que se unen a ligandos específicos (por ejemplo, antígenos). Usando la tecnología de presentación en fagos, se pueden generar grandes bibliotecas de mutantes de proteínas, y se pueden clasificar rápidamente las secuencias que se unen con alta afinidad a antígenos diana. El ácido nucleico que codifica polipéptidos mutantes se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de cubierta vírica, por ejemplo, una proteína del gen III o del gen VIII. Se ha desarrollado un sistema de presentación en fagos monofásico, en el que una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína del gen III. En el sistema de presentación monofásico, un gen fusionado se expresa a un nivel bajo y también se expresa una proteína del gen III de tipo natural, y de este modo se mantiene la infectividad de las partículas.

20 Es importante demostrar la expresión de péptidos en la superficie fibrosa del fago y la expresión de fragmentos de anticuerpos funcionales en el citoplasma periférico de *E. coli* para el desarrollo de bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos. Las bibliotecas de polipéptidos de unión a anticuerpo o antígeno se preparan mediante una serie de métodos, por ejemplo, métodos para modificar un único gen mediante la inserción de una secuencia de ADN aleatoria o la clonación de una secuencia génica relacionada. Las bibliotecas se pueden cribar para determinar la expresión de proteínas de unión a anticuerpo o antígeno que tengan las características deseadas.

35 La tecnología de presentación en fagos tiene varias ventajas sobre los hibridomas convencionales y los métodos recombinantes para producir anticuerpos que tengan características deseadas. Esta técnica proporciona la generación de grandes bibliotecas de anticuerpos con una diversidad de secuencias en un corto tiempo sin usar animales. La producción de hibridomas y la producción de anticuerpos humanizados pueden requerir un tiempo de producción de varios meses. Además, dado que no se requiere inmunidad, las bibliotecas de anticuerpos de fagos pueden generar anticuerpos contra antígenos que son tóxicos o tienen baja antigenicidad. Las bibliotecas de anticuerpos de fagos también se pueden usar para producir e identificar nuevos anticuerpos terapéuticos.

40 Se pueden usar técnicas para generar anticuerpos humanos a partir de seres humanos inmunizados, seres humanos no inmunizados, secuencias de línea germinal o repertorios de Ig de linfocitos B no sensibilizados usando bibliotecas de presentación en fagos. Se pueden usar diversos tejidos linfáticos para preparar bibliotecas de unión a antígeno no sensibilizadas o no inmunogénicas.

50 Las técnicas para identificar y separar anticuerpos de alta afinidad de las bibliotecas de presentación en fagos son importantes para la separación de nuevos anticuerpos terapéuticos. La separación de anticuerpos de alta afinidad de las bibliotecas depende del tamaño de las bibliotecas, la eficiencia de producción en células bacterianas y la diversidad de bibliotecas. El tamaño de las bibliotecas se reduce por el plegamiento ineficiente de la proteína de unión a anticuerpo o a antígeno y la producción ineficiente debido a la presencia del codón finalizador. La expresión en células bacterianas se puede inhibir cuando el dominio de unión a anticuerpo o a antígeno no está plegado correctamente. La expresión se puede mejorar mutando alternativamente los residuos en la superficie de las interfaces variable/constante o los residuos de CDR seleccionados. La secuencia de la región marco es un elemento para proporcionar un plegamiento apropiado al generar bibliotecas de fagos de anticuerpos en células bacterianas.

60 Es importante generar diversas bibliotecas de proteínas de unión a anticuerpo o antígeno en la separación de anticuerpos de alta afinidad. Se ha encontrado a menudo que las regiones CDR3 participan en la unión a antígenos. Dado que la región CDR3 en la cadena pesada varía considerablemente en términos de tamaño, secuencia y morfología estructuralmente dimensional, se pueden preparar diversas bibliotecas usando la misma.

65 Además, se puede crear diversidad al aleatorizar las regiones CDR de cadenas pesadas y ligeras variables usando los 20 aminoácidos en cada posición. El uso de los 20 aminoácidos da como resultado secuencias de anticuerpos con gran diversidad y una mayor probabilidad de identificar nuevos anticuerpos.

El anticuerpo usado en la presente invención incluye, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos

multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, FV monocatenarios (scFV), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), FV unidos por disulfuro (sdFV), anticuerpos antiidiotípicos (anti Id), fragmentos de unión a epítipo de los anticuerpos o similares.

5 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo idéntico, que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, constituyendo cada anticuerpo la población, excluyendo posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se inducen contra un único sitio antigénico.

10 Un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) de tipo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En la mayoría de los casos, el anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo aceptor) en la que un residuo de la región hipervariable de un aceptor se reemplaza por un residuo de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano.

15 La expresión "anticuerpo humano" significa una molécula procedente de inmunoglobulina humana, en donde todas las secuencias de aminoácidos que constituyen el anticuerpo, incluida una región determinante de complementariedad y una región estructural, están compuestas por inmunoglobulina humana.

20 Una parte de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica u homóloga a la secuencia correspondiente en un anticuerpo procedente de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que la otra u otras cadenas incluyen anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) que son idénticos u homólogos a las secuencias correspondientes en un anticuerpo procedente de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dicho anticuerpo que exhiben la actividad biológica deseada.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las regiones de cadena ligera y pesada de una molécula de anticuerpo que incluyen las secuencias de aminoácidos de una región determinante de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y una región marco (FR). VH se refiere a un dominio variable de la cadena pesada. VL se refiere a un dominio variable de la cadena ligera.

30 La expresión "región determinante de complementariedad" (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a un residuo de aminoácido del dominio variable del anticuerpo que es necesario para la unión a antígeno. Cada dominio variable tiene típicamente tres regiones CDR, identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3.

35 La expresión "región marco" (FR) se refiere a un residuo de dominio variable distinto de un residuo CDR. Cada dominio variable tiene típicamente cuatro FR, identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4.

40 Como se usa en el presente documento, el término "biotina" se refiere a una vitamina B soluble en agua (vitamina B7) también denominada vitamina H o coenzima R. La biotina incluye un anillo de ureido (tetrahidroimidizalona) condensado con un anillo de tetrahidrotiofeno.

45 La biotina incluye ácido valérico unido a un átomo de carbono de un anillo de tetrahidrotiofeno. La biotina es una coenzima de la enzima carboxilasa y participa en la síntesis de ácidos grasos, isoleucina y valina, así como en la gluconeogénesis. Además de las características descritas anteriormente como la coenzima, la biotina tiene una constante de disociación K_d de 10^{-14} a 10^{-15} M y tiene una fuerte capacidad de unión a proteínas tales como avidina, estreptavidina y neutravidina (o avidina desglucosilada; neutravidina o avidina desglucosilada). En particular, dado que la unión específica a la estreptavidina se puede mantener incluso en condiciones muy duras, la unión estreptavidina-biotina se ha aplicado de diversas formas en el campo de la biotecnología. Dado que la biotina es de tamaño pequeño y no afecta a la actividad de sustancias fisiológicamente activas tales como las proteínas que la incluyen, se puede unir a diversas sustancias fisiológicamente activas y, por lo tanto, se puede usar para ensayos bioquímicos. Este proceso, es decir, un proceso de unión de la biotina a la sustancia fisiológicamente activa, se denomina "biotinilación".

55 En la presente invención, el fosfolípido incluye uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en fosfolípidos a base de PE (fosfoetanolamina), fosfolípidos a base de PA (ácido fosfatídico), fosfolípidos a base de PG (fosfatidilglicerol), fosfolípidos a base de PS (fosfatidilserina), fosfolípidos a base de PI (fosfatidilinositol), fosfolípidos a base de esfingolípidos y fosfolípidos a base de esteroides, pero sin limitación a los mismos.

60 En la presente invención, el fosfolípido incluye uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en DHPE (1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), fluoresceína DHPE (N-(fluoresceína-5-tiocarbamoil)-1-2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), B-X DHPE (N-((6-(biotinoil)amino)hexanoil)-1-2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), biotina PS (1-oleoil-2-(12-biotinil(aminododecanoil))-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de amonio)), y biotina PC (1-oleoil-2-[12-biotinil(aminododecanoil)]-sn-glicero-3-fosfocolina), pero sin limitación a los mismos.

65 En la presente invención, la célula que sobreexpresa una proteína antigénica, en la que el fosfolípido biotinilado se inserta en la membrana celular y el fosfolípido biotinilado se une al complejo de estreptavidina/perlas magnéticas,

5 puede prepararse mediante el proceso que incluye: (a) cultivar una célula que sobreexpresa una proteína antigénica en presencia de fosfolípido biotinilado para obtener una célula en la que el fosfolípido biotinilado se inserta en la membrana celular; y (b) tratar el fosfolípido biotinilado de la célula obtenida con un complejo de estreptavidina/perlas magnéticas para obtener una célula en la que el fosfolípido biotinilado se inserta en la membrana celular y en la que el fosfolípido biotinilado se une al complejo de estreptavidina/perlas magnéticas.

10 En la presente invención, la célula que sobreexpresa una proteína antigénica, en la que un fosfolípido biotinilado se inserta en la membrana celular y el fosfolípido biotinilado se une al complejo de estreptavidina/perlas magnéticas, puede prepararse a través de un proceso que incluye: (a) hacer reaccionar el fosfolípido biotinilado con estreptavidina y perlas magnéticas para preparar un complejo de fosfolípido/biotina/estreptavidina/perlas magnéticas; y (b) fusionar el complejo de fosfolípido/biotina/estreptavidina/perlas magnéticas a una célula que sobreexpresa una proteína antigénica para obtener una célula que sobreexpresa una proteína antigénica en la que el fosfolípido biotinilado se inserta en la membrana celular y en la que el fosfolípido biotinilado se une al complejo de estreptavidina/perlas magnéticas.

15 En la presente invención, la célula puede fusionarse con el complejo de estreptavidina/perlas magnéticas en un medio que contiene un tensioactivo.

20 En la presente invención, el tensioactivo incluye uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en alquilpoliglucósido, alcohol cetílico, decilglucósido, decilpoliglucósido, maltósidos, NP-40, alcohol oleílico, poloxámero, polisorbato, sorbitán, Triton X-100 y Tween 80, pero sin limitación a los mismos.

25 El sistema basado en magnetismo usado en la presente invención es un dispositivo para separar células usando magnetismo, y es preferentemente KingFisher Flex™, pero sin limitación al mismo.

En la presente invención, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede ser un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se internaliza en una célula.

30 La presente invención también incluye (ii) tratar la célula que incluye perlas magnéticas y sobreexpresar una proteína antigénica con una biblioteca que incluye un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para cribar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína antigénica.

35 El método para medir el contenido de proteína antigénica de las células que sobreexpresan y las células normales puede realizarse midiendo y comparando el nivel de expresión del gen o proteína que codifica la proteína antigénica, y se realiza preferentemente mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en FACS, ELISA, secuenciación de exoma completo y secuenciación de ARN, pero sin limitación a los mismos.

40 El método de acuerdo con la presente invención incluye además (iii) tratar células que no expresan la proteína antigénica con el anticuerpo cribado, o la biblioteca de fragmentos de unión a antígeno del mismo, para seleccionar así solo un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se una específicamente a la proteína antigénica.

45 La etapa (iii) es una etapa de realizar una selección negativa en el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, seleccionado en la etapa (ii), y permite cribar un anticuerpo que tiene alta selectividad por un antígeno.

50 En la presente invención, la célula que se elimina de modo que la proteína antigénica de la etapa (iii) no se exprese puede ser una célula que no exprese de manera natural la proteína antigénica, o puede ser una célula procedente de un paciente que se manipula artificialmente de modo que la proteína antigénica no se exprese. El método de manipulación artificial puede ser cualquier método que sea capaz de evitar que la proteína antigénica se exprese, pero se realiza preferentemente a través del tratamiento con al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un aptámero, ARNip, ARNi monocatenario, microARN y ARNhc que se unen a la proteína antigénica.

55 En la presente invención, la etapa de seleccionar únicamente el anticuerpo que se une a la proteína antigénica usando la célula procedente del paciente que no expresa la proteína antigénica es un cribado negativo, que se realiza inmediatamente después del cribado positivo y tiene el efecto de mejorar la precisión del anticuerpo seleccionado para la proteína antigénica.

60 La presente invención incluye además la separación y/o eliminación de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un antígeno distinto de una proteína antigénica del anticuerpo seleccionado, o fragmento de unión a antígeno del mismo.

65 La separación y/o eliminación puede realizarse usando electroforesis, centrifugación, filtración en gel, precipitación, diálisis, cromatografía (tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía inmunoabsorbente, cromatografía de exclusión por tamaño), enfoque isoelectrico, diversas modificaciones y combinaciones de los mismos, y similares, pero sin limitación a los mismos.

La separación y/o eliminación puede realizarse eliminando impurezas mediante, por ejemplo, centrifugación o ultrafiltración y purificando el resultado usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad. Pueden usarse técnicas de purificación adicionales, tales como cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxapatita y similares.

5 El anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, seleccionado por la presente invención puede ser, por ejemplo, una forma de IgG, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab, un fragmento Fv o un fragmento Fv monocatenario (scFv), pero se produce preferentemente en forma de IgG.

10 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo usado en la presente invención puede incluir no solo un anticuerpo sino también equivalentes biológicos del mismo, siempre que pueda reconocer específicamente una proteína antigénica. Por ejemplo, se pueden realizar variaciones adicionales en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para mejorar aún más la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Dichas variaciones incluyen, por ejemplo, 15 deleción, inserción y/o sustitución de los residuos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Dichas mutaciones de aminoácidos se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, tales como la hidrofobicidad, hidrofilia, carga y tamaño de los mismos. Se puede observar a través del análisis del tamaño, la forma y el tipo de sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos que todos los residuos de arginina, lisina e histidina tienen carga positiva; alanina, glicina y serina tienen tamaños similares; y fenilalanina, triptófano y tirosina tienen formas similares. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, se considera que la arginina, la lisina y la histidina; 20 la alanina, la glicina y la serina; y fenilalanina, el triptófano y la tirosina son equivalentes biológicamente funcionales.

El índice hidropático de los aminoácidos puede tenerse en cuenta al introducir mutaciones. Cada aminoácido tiene un índice de hidrofobicidad asignado en función de su hidrofobicidad y carga, de la siguiente manera: isoleucina (+4,5); 25 valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

El índice de aminoácidos hidrófobos es muy importante para obtener la función biológica interactiva de una proteína. Es un hecho conocido que se requiere la sustitución por un aminoácido que tenga un índice de hidrofobicidad similar 30 para mantener una actividad biológica similar. Cuando se introduce una mutación con referencia al índice de hidrofobicidad, la sustitución se realiza entre aminoácidos que muestran una diferencia en el índice de hidrofobicidad, preferentemente dentro de ± 2 , más preferentemente dentro de ± 1 , e incluso más preferentemente dentro de $\pm 0,5$.

Por otro lado, también es bien conocido que las sustituciones entre aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares dan como resultado proteínas que tienen una actividad biológica uniforme. Como se divulga en la Pat. de EE. UU. N.º 4.554.101, los siguientes valores de hidrofilia se asignan a los respectivos residuos de aminoácidos: 35 arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,511); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); y triptófano (-3,4).

40 En la técnica se conocen intercambios de aminoácidos en proteínas que no cambian totalmente la actividad de la molécula. Los intercambios que tienen lugar con mayor frecuencia son los intercambios entre residuos de aminoácidos de Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

45 Cuando se tienen en cuenta mutaciones que tienen una actividad biológicamente equivalente, se interpreta que el anticuerpo o una molécula de nucleótido que codifica el mismo incluye una secuencia que tiene una identidad sustancial con la secuencia expuesta en el número de secuencia. La expresión "identidad sustancial" significa que una secuencia tiene una homología de al menos el 61 %, preferentemente una homología de al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 % y mucho más preferentemente al menos el 90 %, cuando se alinea la secuencia de modo que se corresponda entre sí tanto como sea posible y se analiza la secuencia alineada usando algoritmos 50 usados comúnmente en la técnica. Los métodos de alineación para la comparación de secuencias se conocen bien en la técnica. La herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) del NCBI es accesible a través del NCBI o similar, y se puede usar junto con programas de análisis de secuencias tales como BLASTP, BLASTM, BLASTX, TBLASTN y BLASTX a través de Internet. BLAST está disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Se puede encontrar un método para comparar la homología de secuencias usando este programa en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html.

Ejemplo

60 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, resultará obvio para los expertos en la técnica que los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención.

65 Ejemplo 1: Confirmación de la fusión de sustancias similares a la membrana celular con la membrana celular

- Para unir las perlas magnéticas a la superficie celular, se confirmó si un material similar a la membrana celular, al que está unida la biotina, se fusionó o no a la superficie celular usando un citómetro de flujo como proceso de pretratamiento. Se usó DHPE (1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) como material similar a la membrana celular (figura 2). La prueba se realizó usando una sustancia fluorescente adherida a DHPE, concretamente fluoresceína DHPE (N-(fluoresceína-5-tiocarbamoil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio, producida por Invitrogen Corporation), en diversas condiciones de concentración (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000), condiciones de temperatura (temperatura ambiente, 4 °C) y condiciones de tiempo de reacción (30 minutos, 60 minutos).
- 5
- 10 En primer lugar, HCC.95, una estirpe celular cancerosa, se dispuso en 500.000 células en cada condición, y el volumen de reacción fue de 300 µl. La muestra cultivada se centrifugó a razón de 1.500 rpm durante 3 minutos con una solución de FBS al 1 % y a continuación se lavó para eliminar el sobrenadante. Esto se repitió dos veces. A continuación, el análisis se realizó a través de un citómetro de flujo (FACS Aria III).
- 15 Como resultado, se observó que la intensidad de fluorescencia era proporcional a la concentración en todas las condiciones (figura 3A). Basándose en esto, se confirmó que un material similar a la membrana celular se fusionó a la superficie de las células viables, y que el resultado obtenido al incubar la misma muestra a 4 °C durante 6 horas y a continuación al medir la intensidad de fluorescencia usando un citómetro de flujo también mostró el mismo patrón (figura 3B). Esto significa que, incluso si una sustancia similar a la membrana celular se fusiona a la membrana celular,
- 20 la célula es estable.

Ejemplo 2: Confirmación y optimización de la fusión de sustancias similares a la membrana celular unidas a biotina a la célula

- 25 La prueba se realizó usando la sustancia realmente adherida a las perlas magnéticas, concretamente, BX DHPE (N-((6-(biotinoyl)amino)hexanoil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio, producida por Invitrogen Corporation), en diversas condiciones de concentración (0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml y 0,0625 mg/ml) (figura 4).
- 30 En primer lugar, HCC.95, una estirpe celular cancerosa, se dispuso en 500.000 células en cada condición, y el volumen de reacción fue de 300 µl. La muestra cultivada se centrifugó a razón de 1.500 rpm durante 3 minutos con una solución de FBS al 1 % y a continuación se lavó para eliminar el sobrenadante. Esto se repitió dos veces. A continuación, se hizo reaccionar estreptavidina-FITC (material fluorescente) que tiene capacidad de unión específica a la biotina a 4 °C durante 1 hora. La muestra cultivada se centrifugó a razón de 1.500 rpm durante 3 minutos con una
- 35 solución de FBS al 1 % y a continuación se lavó para eliminar el sobrenadante. Esto se repitió dos veces. A continuación, el análisis se realizó usando un citómetro de flujo (FACS Aria III).

Como resultado, se confirmó que la intensidad de fluorescencia tenía el mismo comportamiento que en el Ejemplo 1 (figura 5A).

- 40 Con el fin de optimizar las condiciones de fusión de la sustancia con respecto a la membrana celular, la prueba se realizó en diversas condiciones de concentración de B-X DHPE (0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml y 0,0625 mg/ml), condiciones de temperatura (4 °C, temperatura ambiente) y condiciones de tiempo de reacción (30 minutos, 60 minutos), y la preparación de la muestra se realizó de la misma manera que anteriormente.

- 45 Como resultado, se confirmó que la fusión del material con la membrana celular fue la mejor en la concentración de B-X DHPE (0,5 mg/ml), a temperatura ambiente y durante el tiempo de reacción de 30 minutos (figura 5B).

- 50 Ejemplo 3: Confirmación de la expresión de la proteína de superficie en células fusionadas con una sustancia similar a la membrana celular

- Aunque una sustancia similar a la membrana celular se fusiona con una célula, no es adecuada para su uso en la selección celular basada en la presentación en fagos cuando hay un cambio en la expresión de la proteína de superficie. Por lo tanto, se confirmó que las condiciones optimizadas de B-X DHPE no afectaron a la proteína de superficie celular, y también se confirmó la cantidad de B-X DHPE que se fusionó con la superficie celular.
- 55

- Se usó GBM15-682T, una célula procedente de un paciente. Esta célula sobreexpresa la proteína de superficie celular FGFR3 y, por lo tanto, es adecuada para la comparación del nivel de expresión. El nivel de expresión de la proteína de superficie celular FGFR3 se midió a través de un citómetro de flujo en la condición en la que la sustancia similar a la membrana celular (B-X DHPE) estaba fusionada y en la condición en la que la sustancia similar a la membrana celular no estaba fusionada. Se dispuso GBM15-682T en 500.000 células en cada condición, se usó en un volumen de reacción de 300 µl y se hizo reaccionar con B-X DHPE (0,5 mg/ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La muestra cultivada se centrifugó a razón de 1.500 rpm durante 3 minutos con una solución de FBS al 1 % y a continuación se lavó para eliminar el sobrenadante. Esto se repitió dos veces.
- 60

- 65 A continuación, la célula se trató con anticuerpos de estreptavidina-FITC (material fluorescente) y FGFR3-PE (material

fluorescente), respectivamente, y se hizo reaccionar a 4 °C durante 1 hora. Después de realizar el lavado como se ha descrito anteriormente dos veces, B-X DHPE se analizó a través de fluorescencia FITC y FGFR3 se analizó a través de fluorescencia PE.

- 5 Como resultado, se confirmó que no hubo cambios en el nivel de B-X DHPE fusionado a la superficie celular y el nivel de proteína de superficie celular FGFR3 expresada (figura 6). Es decir, el resultado significa que, aunque la sustancia similar a la membrana celular (B-X DHPE) está fusionada a la membrana celular, no causa ninguna alteración en la superficie celular.
- 10 Ejemplo 4: Inducción de magnetización a través de la unión de perlas magnéticas a células fusionadas con sustancias similares a la membrana celular y optimización de las condiciones

4-1: Confirmación del efecto del método de unión a complejo

- 15 B-X DHPE fusionado a células contiene un componente de biotina y, por lo tanto, tiene capacidad de unión específica a la estreptavidina. Por lo tanto, es posible inducir magnetismo en células usando perlas magnéticas adheridas a estreptavidina (Dynabeads de estreptavidina: Dynabeads M-280 streptavidin; Invitrogen Corporation). Como método para inducir la magnetización mediante la unión de perlas magnéticas a las células, se compararon un método directo y un método indirecto. El método directo se refiere a un método de hacer reaccionar primero B-X DHPE con Dynabeads de estreptavidina y a continuación fusionar el resultado con las células, y el método indirecto se refiere a un método para fusionar B-X DHPE con las células y a continuación hacer reaccionar el resultado con Dynabeads de estreptavidina.
- 20

El método directo se realizó de la siguiente manera. Se hicieron reaccionar 3,0 µg de B-X DHPE con 500 µg de Dynabeads de estreptavidina previamente lavadas con una solución de tampón de PBS (pH 7,4) usando un separador magnético a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, el resultado se lavó dos veces con la misma solución de tampón usando un separador magnético. Se cultivaron 1,0-5,0e+6 células, previamente lavadas con una solución de tampón de PBS (pH 7,4), junto con el conjugado de B-X DHPE y Dynabead de estreptavidina previamente en reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. En este momento, el volumen de reacción se fijó en 1 ml.

25

30

El método indirecto se realizó de la siguiente manera. Se cultivaron 1,0-5,0E+6 células lavadas con una solución de tampón de PBS (pH 7,4) junto con 3 µg de B-X DHPE durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces con una solución de tampón de PBS (pH 7,4) usando un separador magnético. Se cultivaron 500 µg de Dynabeads de estreptavidina previamente lavadas con una solución de tampón de PBS (pH 7,4) usando un separador magnético junto con células fusionadas con B-X DHPE a temperatura ambiente durante 1 hora. El volumen de reacción fue el mismo que en el método directo.

35

Se confirmó a través de la presente invención que entre los dos métodos, el método directo es capaz de unir más fácilmente las perlas magnéticas a las células (figura 7). Es decir, el método directo es eficaz para inducir el magnetismo de las células a través de las perlas magnéticas.

40

4-2: Optimización de la tasa de adhesión de las perlas magnéticas

Para aumentar la tasa de adhesión de las perlas magnéticas a las células, se optimizó la solución de tampón de reacción. Se aplicaron ① medio de cultivo, ② PBS (pH 7,4), ③ EDTA 2 mM/BSA al 0,1 % y ④ Pluronic F-68 (Gibco) al 0,1 % al método directo realizado anteriormente. El conjugado de B-X DHPE y Dynabeads de estreptavidina se cultivó junto con las células preparadas previamente en las cuatro condiciones de solución de tampón respectivas anteriores. Una vez finalizado el cultivo, cada muestra se transfirió a una placa de 6 pocillos y se analizó con un microscopio (20X, 40X).

45

50

Como resultado, se confirmó que las condiciones de cultivo de Pluronic F-68 al 0,1 % exhibieron una mayor tasa de adhesión de perlas magnéticas a las células (figura 8).

El número de células en las que se induce la magnetización mediante la unión de perlas magnéticas se midió usando el número de células usado para la selección celular real. Las células 2e+6 usadas habitualmente para la selección celular se magnetizaron usando 6 µg de B-X DHPE y 2 mg de Dynabeads de estreptavidina. Después de unir las células al imán mediante la aplicación de magnetismo a las células usando un dispositivo basado en magnetismo (KingFisher Flex, Thermo Scientific) o un separador magnético, el sobrenadante se eliminó, las células se suspendieron de nuevo en 1 ml de solución de tampón de PBS (pH 7,4) y se calculó el número de células con un C-Chip. Los experimentos repetidos mostraron que aproximadamente el 90 % o más de las células se magnetizaron e interactuaron con el imán (figura 9).

55

60

Ejemplo 5: Aplicación de células adheridas a perlas magnéticas a un dispositivo basado en magnetismo y selección celular automática

65

En la presente invención, se desarrolló la selección celular automática fusionando la tecnología de presentación en

fagos usando una célula adherida a perlas magnéticas a través de un dispositivo basado en magnetismo (KingFisher Flex, Thermo Scientific). Por lo tanto, se confirmó si las células a las que se adhirieron las perlas magnéticas fueron guiadas por el dispositivo basado en magnetismo o un separador magnético y se movieron o fijaron a través del magnetismo.

5 Los dispositivos basados en magnetismo pueden designar ocho posiciones de placa. Después de colocar una placa con 24 pocillos profundos en las ocho posiciones de placa, se dispuso 1 ml de PBS en cada posición. A continuación, las células a las que se adhirieron perlas magnéticas se designaron y se sembraron en la primera placa, y se transfirieron de la primera placa a la segunda placa con una varilla magnética del dispositivo a través del software (BindIt 3.3 para KingFisher) para el funcionamiento del dispositivo basado en magnetismo. En este momento, se confirmó que las células a las que se habían adherido perlas magnéticas se habían movido de la primera placa a la segunda placa. Esto se realizó repetidamente hasta la octava placa (figuras 10 y 11).

15 Después de la finalización, se midió el número de células que quedaban en la solución de tampón PBS (pH 7,4) de cada placa mediante un C-Chip. Además, se comparó el número de células que finalmente se movieron a la octava placa con el número de células que quedaban después del método general de selección celular.

20 El resultado mostró que el número de células que quedaban después del método de selección celular a través de un dispositivo basado en magnetismo era similar al número de células que quedaban después del método de selección celular realizado directamente por un experimentador (figura 12).

25 La selección celular automática permite la selección simultánea de 24 a 96 células y la realización de un sistema de cribado masivo de alta velocidad. Además, las condiciones de unión, lavado, elución y lisis se pueden controlar de forma flexible en cada etapa de selección, y el tiempo necesario para ello se puede acortar.

Ejemplo 6: Adhesión de perlas magnéticas a células procedentes de paciente que sobreexpresan antígeno y aplicación de selección celular automática mediante un dispositivo basado en magnetismo usando las mismas

30 Se adhirieron perlas magnéticas a células viables mediante el método experimental desarrollado en la presente invención, y se realizó una selección celular automática sobre las mismas usando un dispositivo basado en magnetismo. El antígeno usado en este ejemplo fue el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF3), y el antígeno recombinante usado en este ejemplo fue el FGF R3 (IIIc) humano recombinante, una proteína quimera Fc producida por R&D Systems.

35 En primer lugar, se realizó cuatro veces (rondas) una bioselección mediante un método conocido de manera común y general para fijar un antígeno en un inmunotubo para obtener un grupo de fagos en el que se amplifican los fagos específicos de antígeno a través de la cuarta iteración de la bioselección, se realizó una selección celular automática una vez (una ronda) usando el grupo de fagos y un dispositivo basado en magnetismo en condiciones de lavado intenso (intensidad de lavado establecida en Rápido en la etapa de Lavado en BindIt Software 3.3.1, software de equipo KingFisher Flex) y condiciones de lavado débil (intensidad de lavado establecida en Media o Lenta en la etapa de lavado), y a continuación se contó y se recuperó el resultado de la selección celular.

45 A continuación, se realizó una selección automática cuatro veces a través de una selección de perlas magnéticas basada en proteínas recombinantes usando un dispositivo basado en magnetismo KingFisher Flex (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) para obtener un grupo de fagos en el que los fagos específicos de antígeno se amplifican a través de la cuarta iteración de la bioselección, se realizó una selección celular automática a través de un dispositivo basado en magnetismo una vez usando el grupo de fagos en condiciones de lavado débil (la intensidad de lavado se estableció en Media o Lenta en la etapa de lavado), y a continuación se contó y se recuperó el resultado de la selección celular.

50 Para recuperar y contar los fagos que tienen una capacidad de unión más específica a determinadas estructuras de antígeno expresadas en la superficie celular real del grupo recuperado en condiciones normales y el grupo recuperado a través de la selección automática, se realizó automáticamente una selección de células adheridas a perlas magnéticas usando un dispositivo basado en magnetismo a través del método de selección desarrollado en la presente invención.

55 Se usaron células procedentes de paciente PDC N.º 1, que sobreexpresan un antígeno, y células procedentes de paciente PDC N.º 2, que subexpresan un antígeno, para la selección celular automática. En primer lugar, las células PDC N.º 2 (2×10^6 células/biblioteca) que subexpresan un antígeno previamente lavado con PBS, y perlas magnéticas previamente lavadas (Dynabeads) se hicieron reaccionar con el grupo de fagos amplificados en el antígeno cuatro veces a temperatura ambiente durante 1 hora y, a continuación, la muestra se centrifugó para recuperar solo el sobrenadante y para eliminar los fagos no específicos para el antígeno y los fagos no específicos para las perlas magnéticas.

65 El sobrenadante recuperado se introdujo en un dispositivo automatizado (KingFisher Flex, Thermo Scientific, EE. UU.) junto con células procedentes de paciente adheridas a perlas magnéticas a través del método desarrollado en la presente invención, y el protocolo de software operativo correspondiente se muestra en la figura 13.

Los fagos recuperados mediante la selección celular automática se infectaron en células hospedadoras TG1 y se contaron en un medio de cultivo de LB/ampicilina. Para determinar la cantidad de fagos que se recuperaron, la solución recuperada se diluyó y se infectó en células hospedadoras, a continuación se extendió en un medio de agar LB/ampicilina y se cuantificó a través del número de colonias al día siguiente (figura 14). La solución recuperada restante se extendió en un medio de cultivo de 15 cm y se cultivó, y a continuación se añadieron 5 ml de medio de cultivo SB (glicerol al 50 %) a la misma para recuperar y almacenar las colonias (-80 °C).

Ejemplo 7: Resultados del cribado de anticuerpos basado en ELISA con capacidad de unión específica para determinado antígeno usando resultados de selección automática

Los anticuerpos específicos de FGFR3 se seleccionaron a través de cribado ELISA scFv convencional y general. Las células hospedadoras (TG1) se infectaron con el grupo de fagos recuperado mediante selección celular automática en cada condición y se obtuvo una única colonia de las mismas que a continuación se usó para la verificación mediante ELISA. Cada colonia individual se inoculó en un pocillo lleno de 200 µl de SB/ampicilina en una placa de 96 pocillos (37 °C, 3 horas) y el medio de cultivo se trató con una concentración final de IPTG 1 mM para inducir la expresión de proteínas, y a continuación se cultivó a 28 °C durante 16 horas o más.

Al día siguiente, la placa de cultivo se trató con una solución de TES (sacarosa al 20 % p/v, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para recoger el scFv presente alrededor de la región citoplasmática circundante de las células hospedadoras de *E. coli* que quedaron en cada pocillo después de la centrifugación y la eliminación del sobrenadante y se dejó reposar a 4 °C, a continuación, el sobrenadante se recuperó a través de una centrifuga, se trató en una placa de 96 pocillos recubierta con un antígeno específico de antemano y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, se realizó un proceso de lavado y se realizó un tratamiento con anti HA HRP junto con un tampón de bloqueo durante 1 hora, se realizó el mismo proceso de lavado, a continuación se realizó un tratamiento con un sustrato TMB y se realizó un análisis con una D.O. de 450 nm.

Como resultado, como se puede observar en la figura 16, los scFv que son más específicos para FGFR3 expresados en la superficie celular real y más estables estructuralmente podrían seleccionarse automáticamente del grupo de scFv que tiene capacidad de unión específica para el FGFR3 obtenido a través de bioselección usando una proteína recombinante, y los anticuerpos específicos para diversas bibliotecas y diversos antígenos o células podrían seleccionarse automáticamente a través de un dispositivo basado en magnetismo.

Aplicabilidad industrial

El método para adherir perlas magnéticas a células viables de acuerdo con la presente invención es un método que se puede aplicar a la bioselección basada en presentación en fagos usando células inducidas por magnetismo. El método es capaz de seleccionar anticuerpos manteniendo al mismo tiempo la estructura de la proteína de la superficie celular, y tiene una mayor posibilidad de seleccionar anticuerpos específicos de antígeno que un método de selección usando proteínas recombinantes. Además, el método es capaz de seleccionar anticuerpos contra una gran cantidad de diversos antígenos con poco trabajo a través de la aplicación a un dispositivo y sistema de detección masiva de alta velocidad basados en magnetismo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cribar un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína antigénica, comprendiendo el método:

5 (i) preparar una célula que sobreexpresa una proteína antigénica, en la que un fosfolípido biotinilado se inserta en una membrana de la célula y el fosfolípido biotinilado se une a un complejo de estreptavidina/perlas magnéticas,

10 (a) mediante el tratamiento de un complejo de fosfolípido/biotina/estreptavidina/perlas magnéticas, preparado mediante la reacción de un fosfolípido biotinilado con estreptavidina y perlas magnéticas, con respecto a una célula que sobreexpresa una proteína antigénica, o

(b) mediante el tratamiento de un complejo de estreptavidina/perlas magnéticas con respecto a una célula en la que se inserta un fosfolípido biotinilado en la membrana celular preparada mediante el cultivo de la célula en presencia del fosfolípido biotinilado;

15 (ii) tratar la célula con una biblioteca de anticuerpos, o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y seleccionar anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a la célula que sobreexpresa la proteína antigénica usando un sistema basado en magnetismo;

20 (iii) hacer reaccionar los anticuerpos seleccionados, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, con una célula que no expresa la proteína antigénica para seleccionar únicamente un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, que se une específicamente a la proteína antigénica; y

25 (iv) separar y/o eliminar los anticuerpos, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a la célula que no expresa la proteína antigénica de los anticuerpos seleccionados, o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, obteniendo así los anticuerpos, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a la proteína antigénica.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fosfolípido comprende uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en fosfolípidos a base de PE (fosfoetanolamina), fosfolípidos a base de PA (ácido fosfatídico), fosfolípidos a base de PG (fosfatidilglicerol), fosfolípidos a base de PS (fosfatidilserina), fosfolípidos a base de PI (fosfatidilinositol), fosfolípidos a base de esfingolípidos y fosfolípidos a base de esteroides.

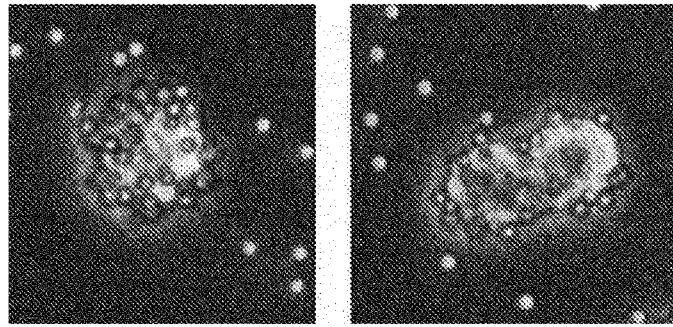
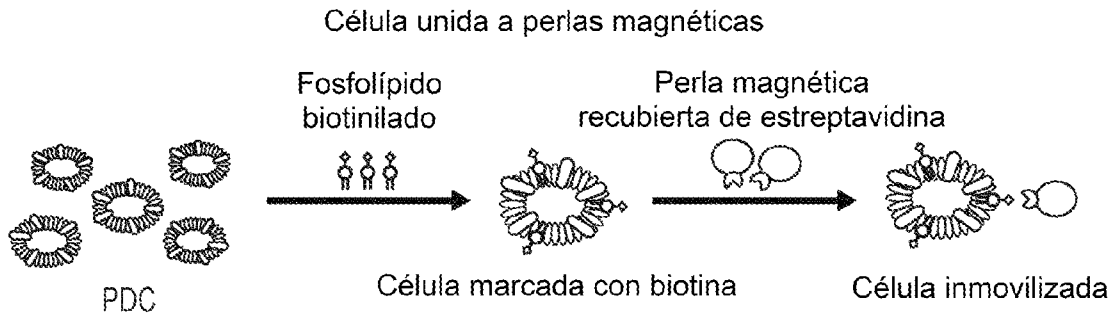
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el fosfolípido comprende uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en DHPE (1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), fluoresceína DHPE (N-(fluoresceína-5-tiocarbamoil)-1-2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), B-X DHPE (N-((6-(biotinoil)amino)hexanoil)-1-2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), biotina PS (1-oleoil-2-(12-biotinil(aminododecanoil))-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de amonio)), y biotina PC (1-oleoil-2-[12-biotinil(aminododecanoil)]-sn-glicero-3-fosfocolina).

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula se trata con el complejo de estreptavidina/perlas magnéticas en un medio que contiene un tensioactivo.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el tensioactivo comprende uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en alquilpoliglucósido, alcohol cetílico, decilglucósido, decilpoliglucósido, maltósidos, NP-40, alcohol oleílico, poloxámero, polisorbato, sorbitán, Triton X-100 y Tween 80.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sistema basado en magnetismo es un dispositivo para separar células usando magnetismo.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se internaliza en una célula.



Bioselección basada en células unidas a perlas magnéticas

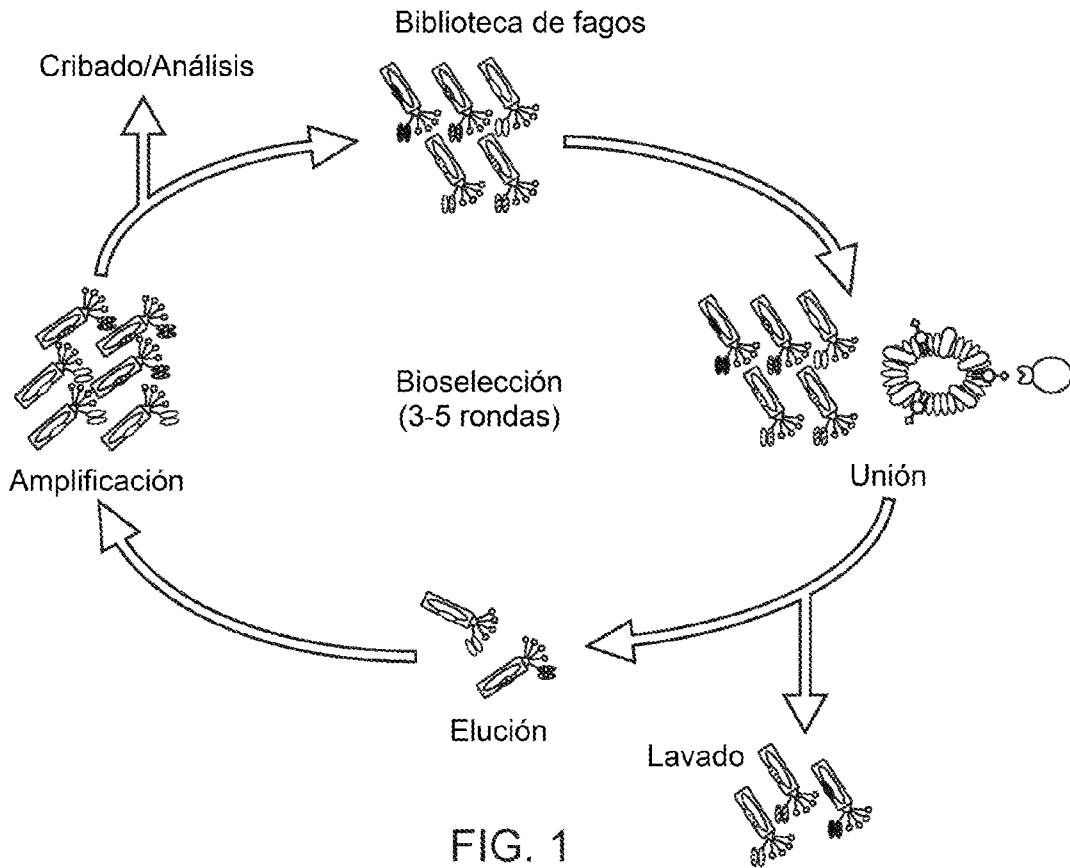
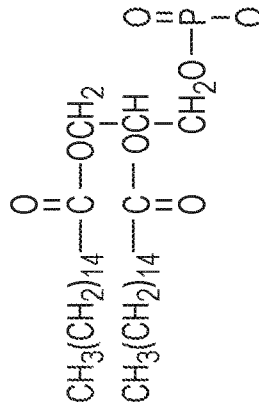
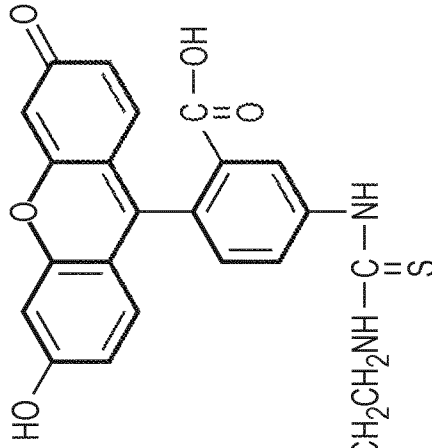


FIG. 1

(A)

DHPE-FITC

Fluoresceína DHPE (*N*-(fluoresceína-5-tiocarbamoil)-1-2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolina, sal de trietilamonio)



Fórmula molecular: $\text{C}_{64}\text{H}_{100}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{PS}$
 |Peso molecular: 1182,54006

+
 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$

(B)

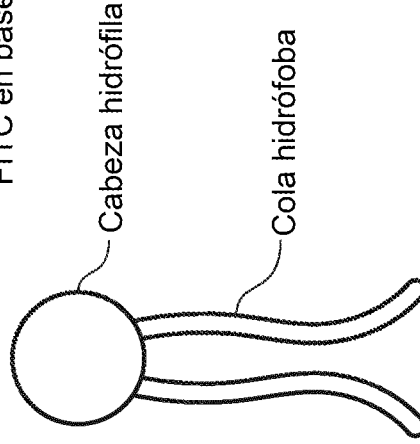
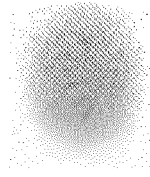
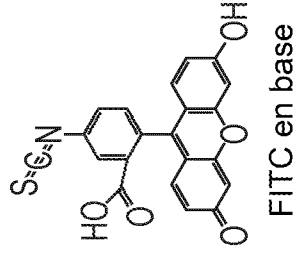


FIG. 2

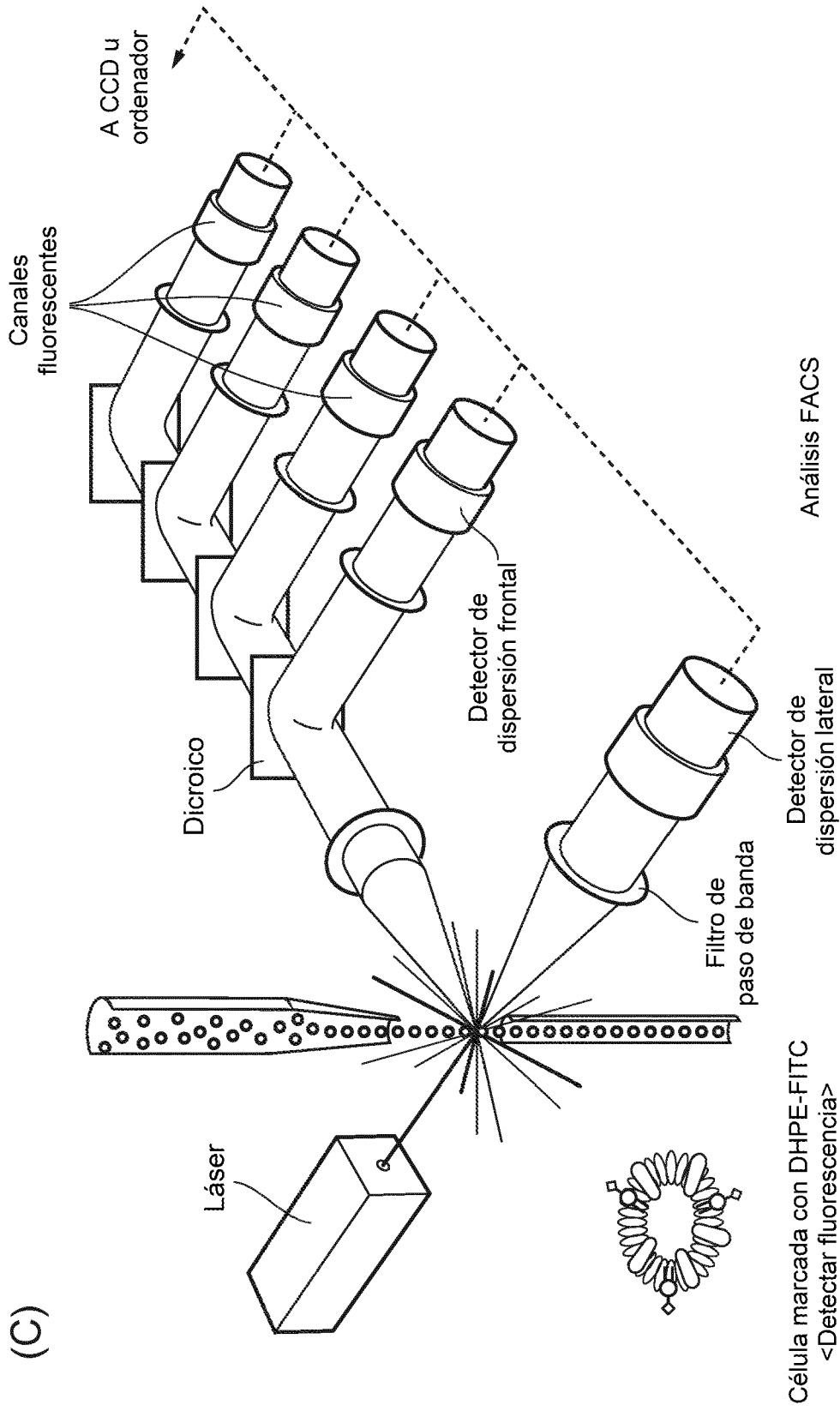


FIG. 2 (Continuación)

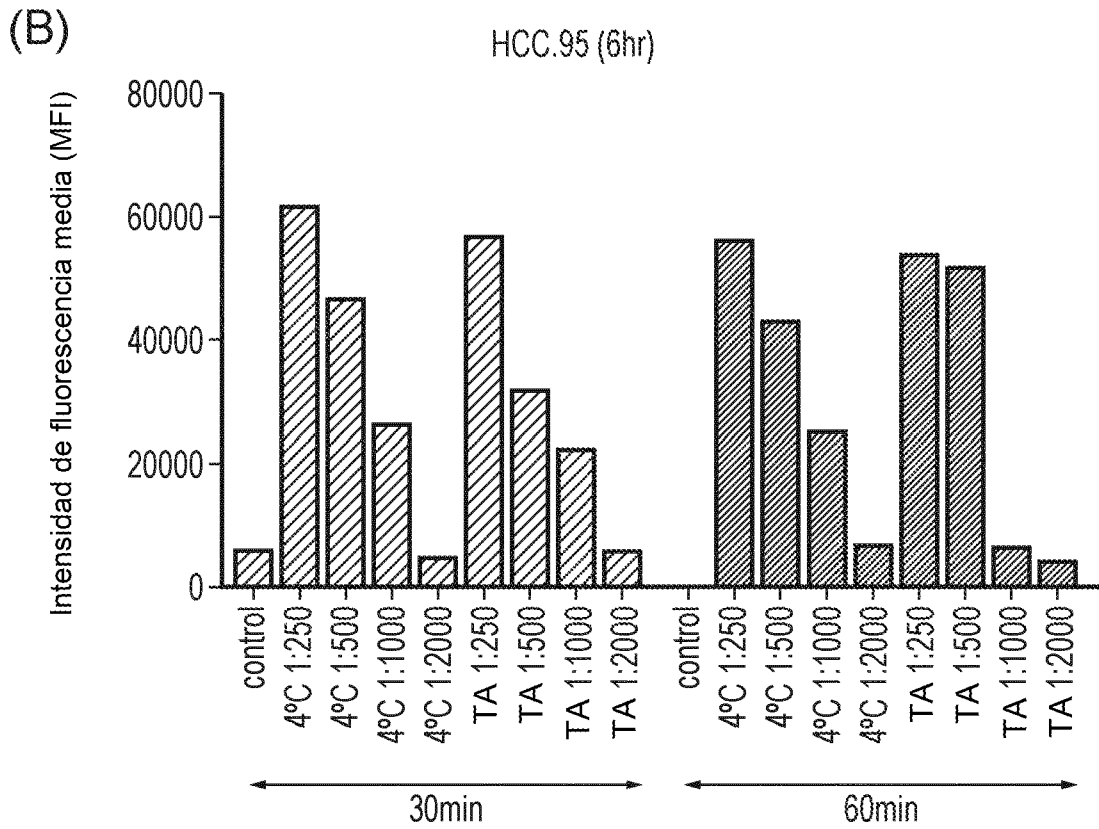
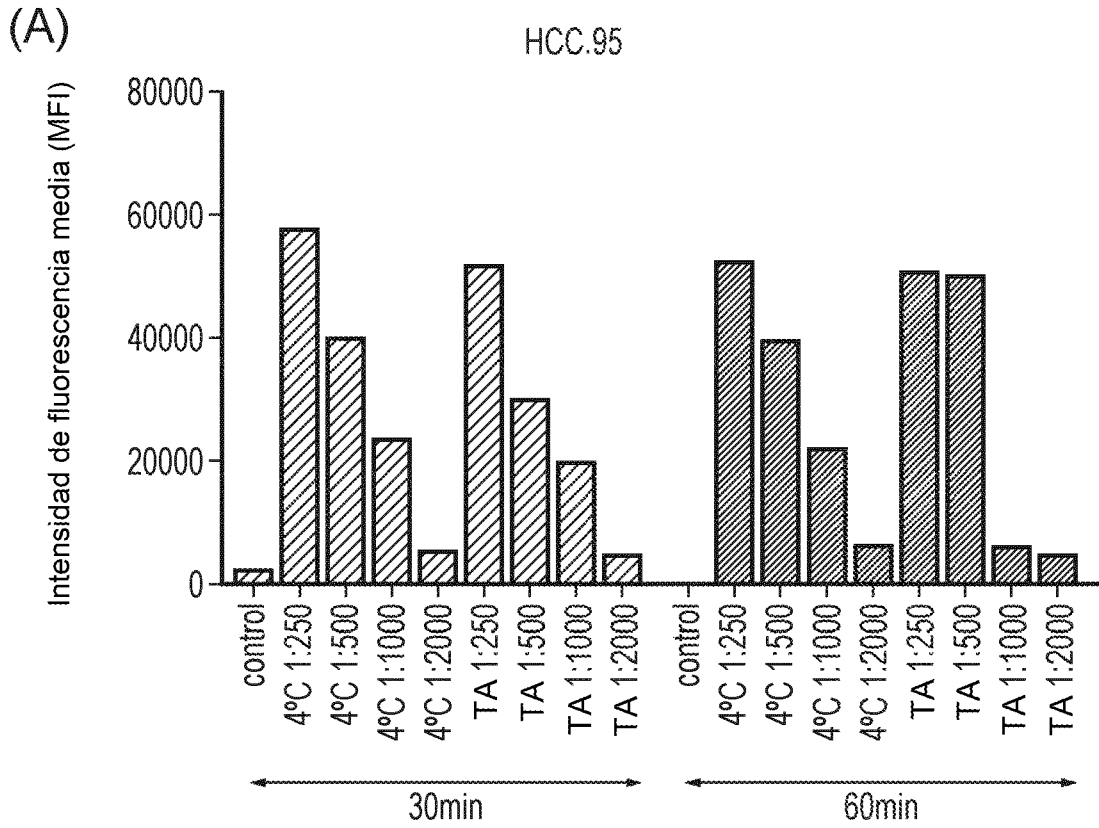
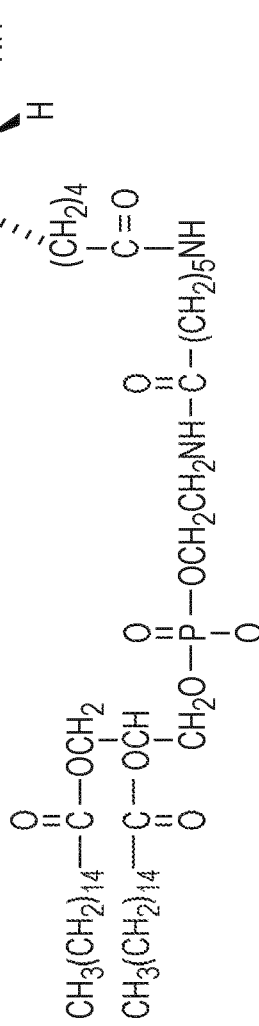


FIG. 3

(A)

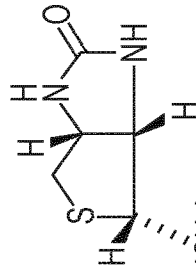
B-X DHPE

Biotina-X DHPE (N-((6-Biotinoil)amino)hexanoil)-1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio)



Fórmula molecular: $\text{C}_{59}\text{H}_{114}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{PS}$

$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$ Peso molecular: 1132,61026



(B)

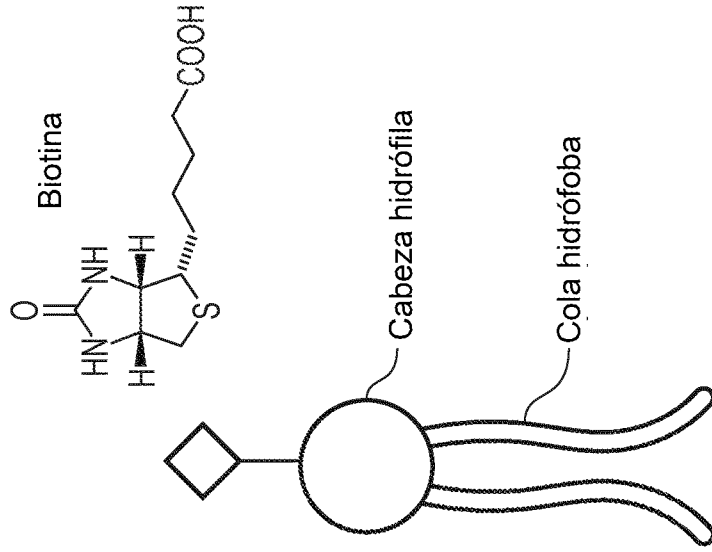


FIG. 4

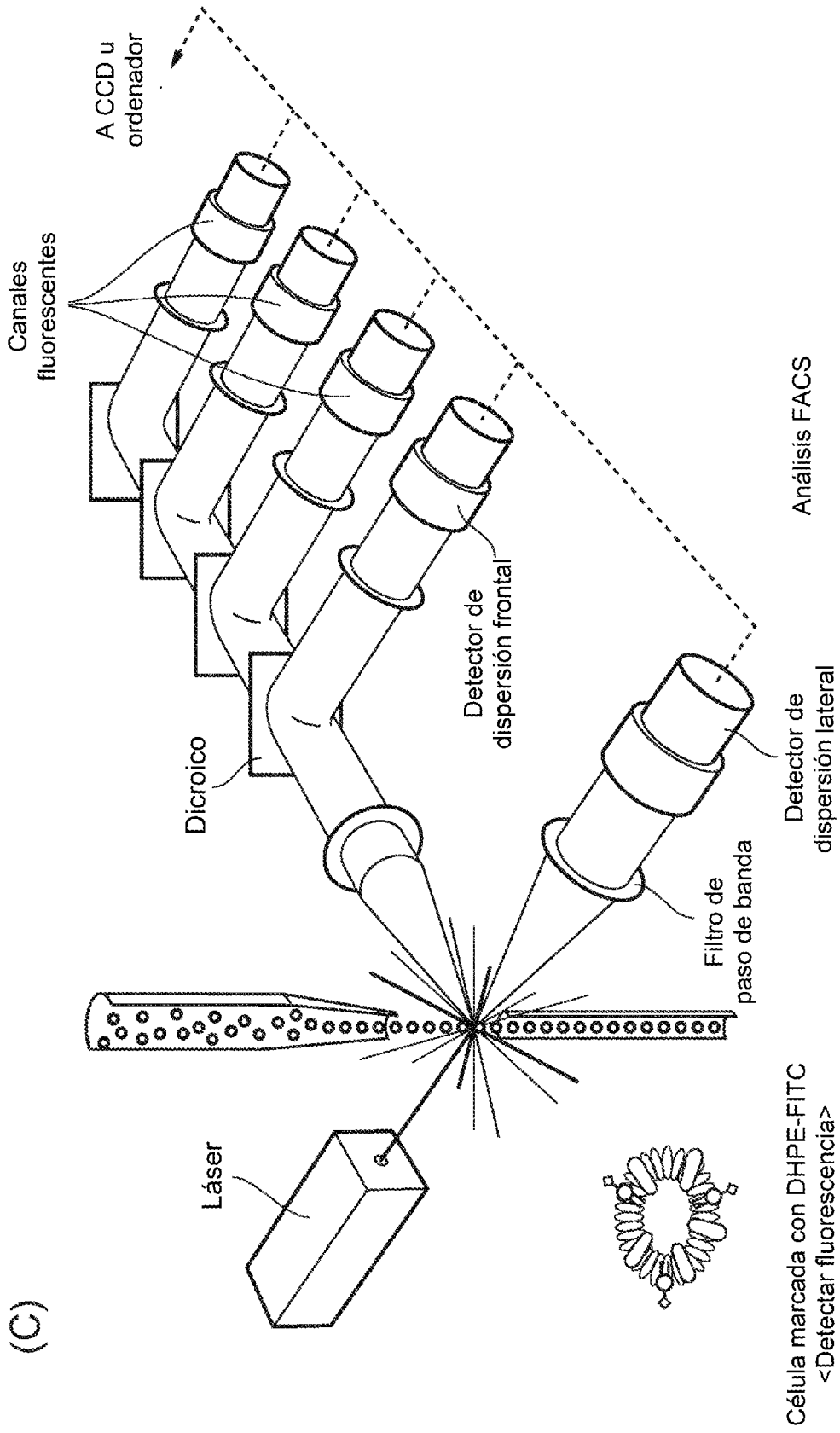


FIG. 4 (Continuación)

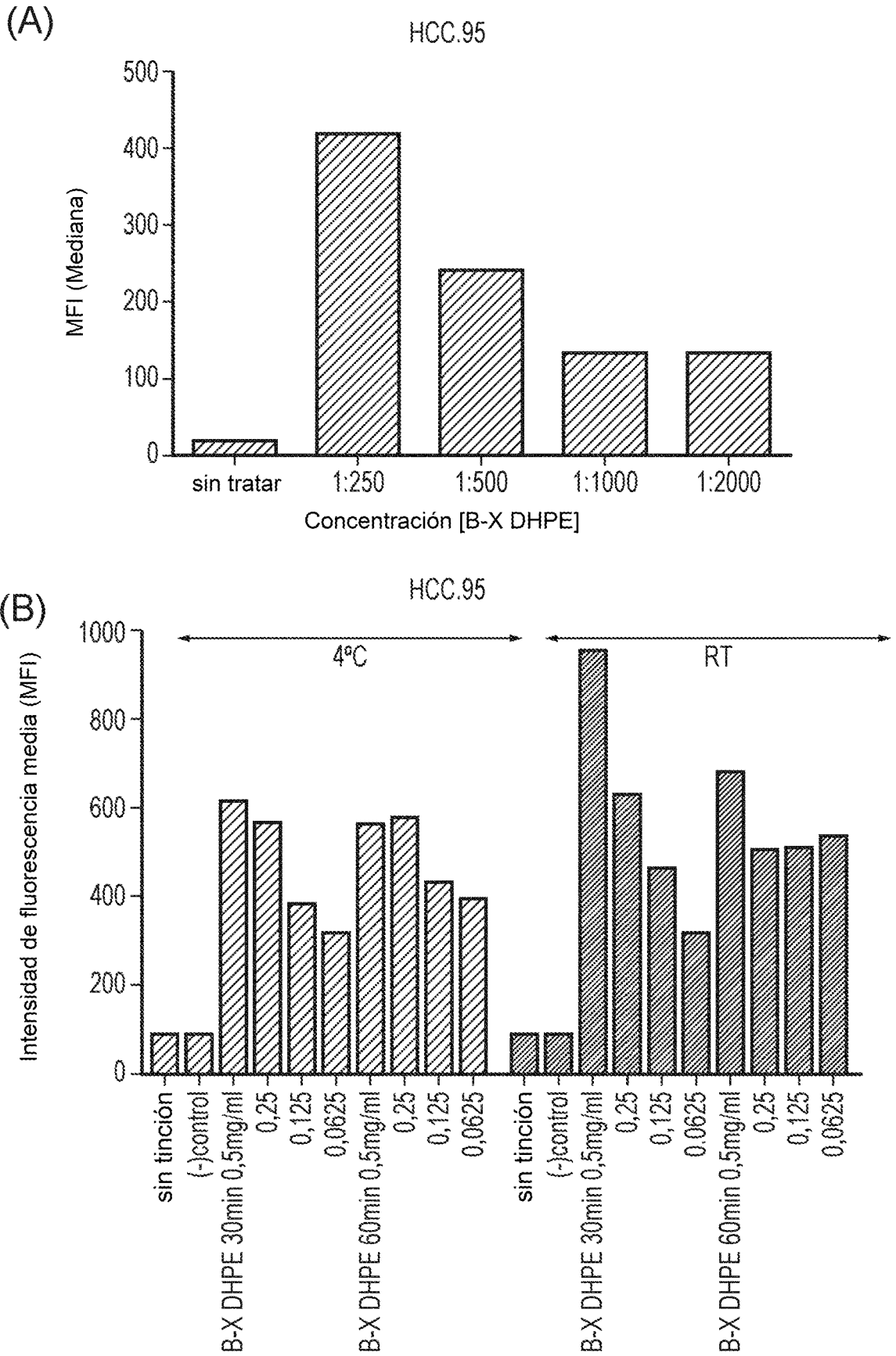


FIG. 5

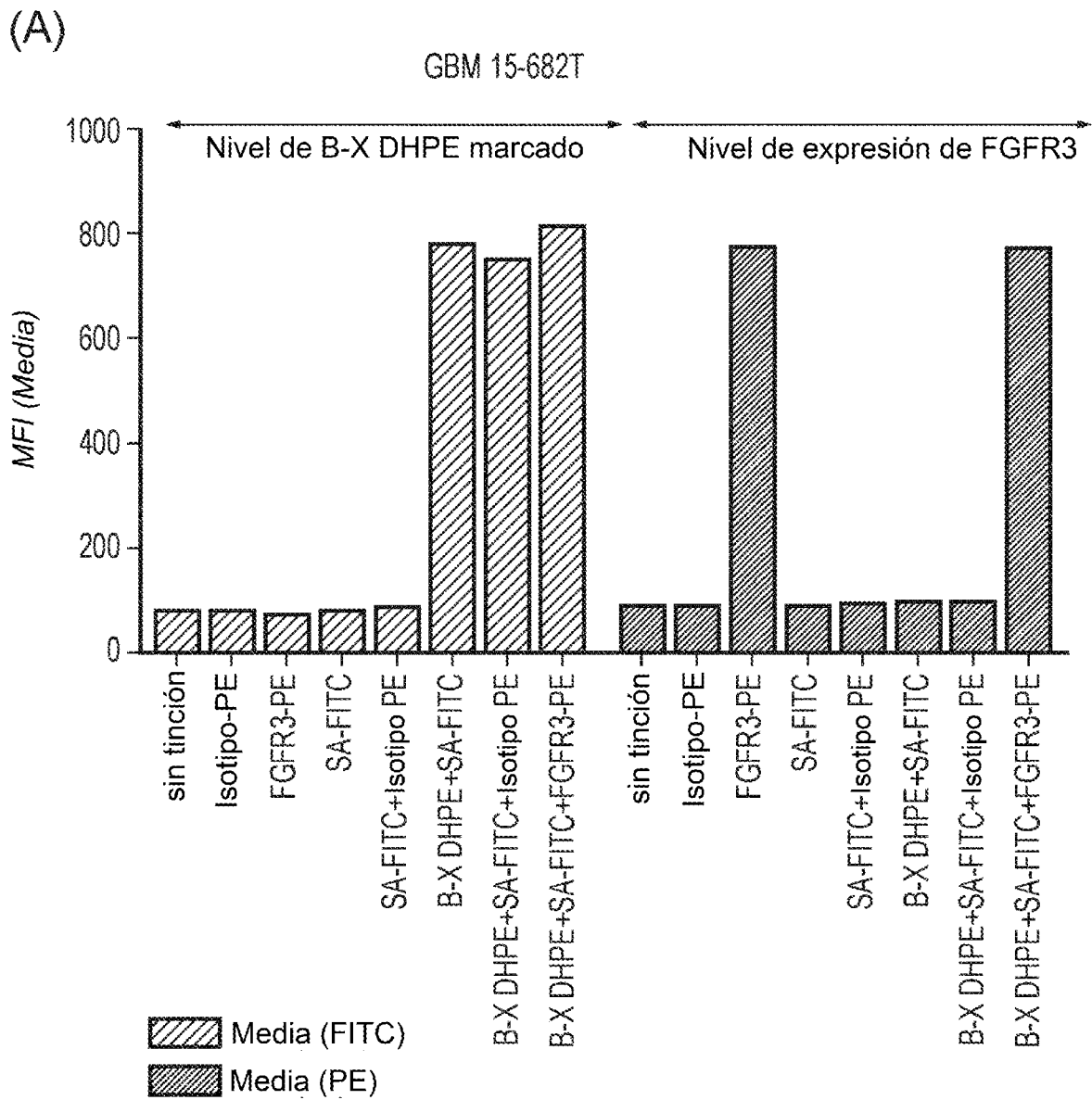


FIG. 6

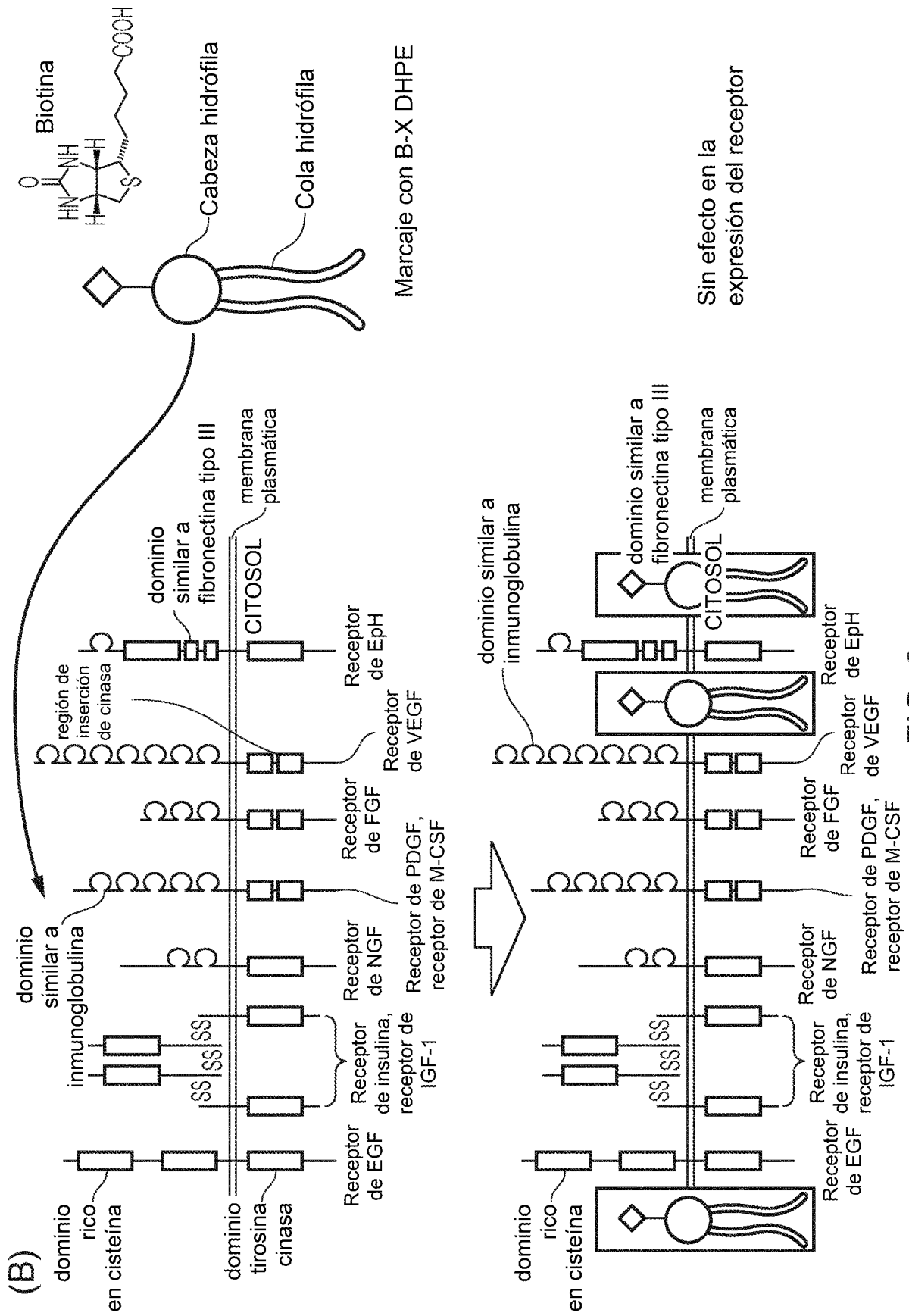
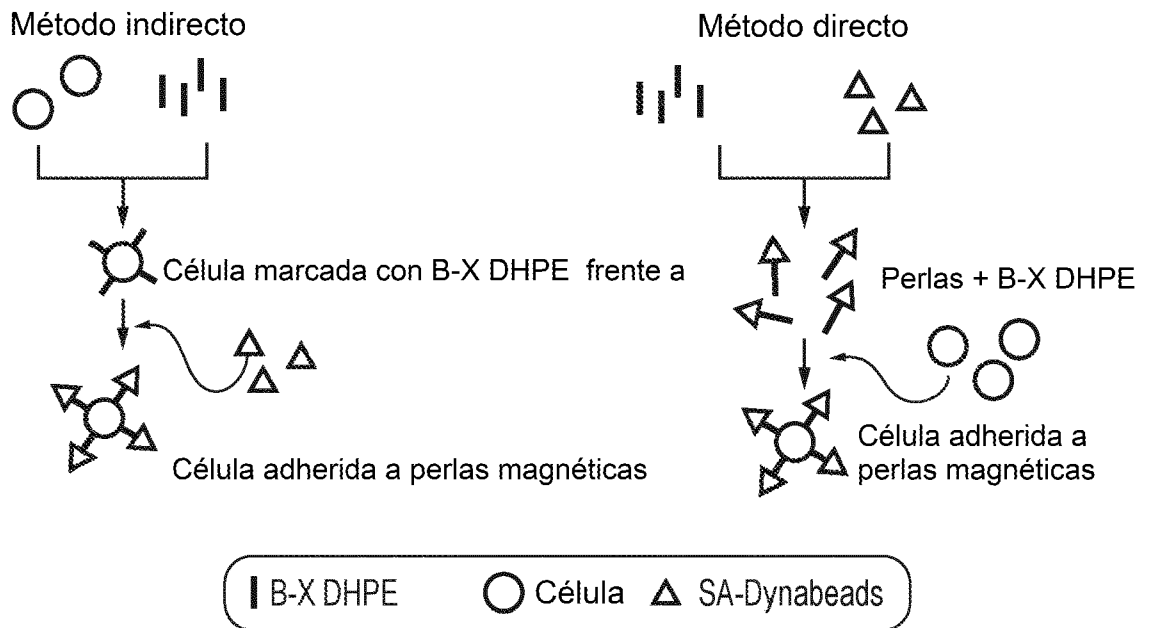
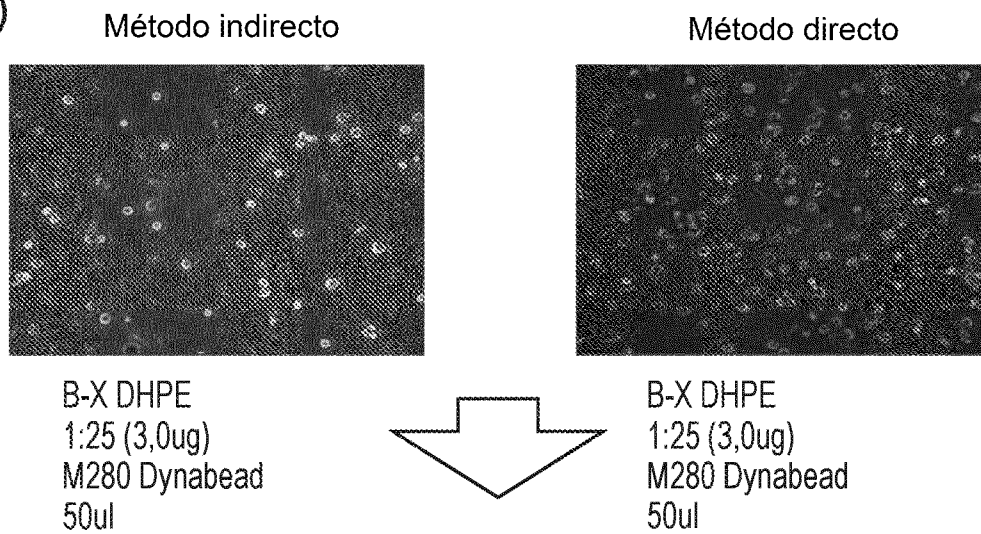


FIG. 6 (Continuación)

(A)



(B)



El resultado de comparar los dos métodos en las mismas condiciones experimentales mostró que el método directo es capaz de adherir perlas magnéticas a una mayor cantidad de células.

FIG. 7

B-X DHPE	3ug			6ug		
Muestra	1	2	3	4	5	6
Célula	5,0E+5	5,0E+5	5,0E+5	5,0E+5	5,0E+5	5,0E+5
Dynabeads	500ug	500ug	500ug	500ug	500ug	500ug
Tampón de aislamiento	PBS	BSA 0,1 % EDTA 2 mM	Pluronic F68	PBS	BSA 0,1 % EDTA 2 mM	Pluronic F68

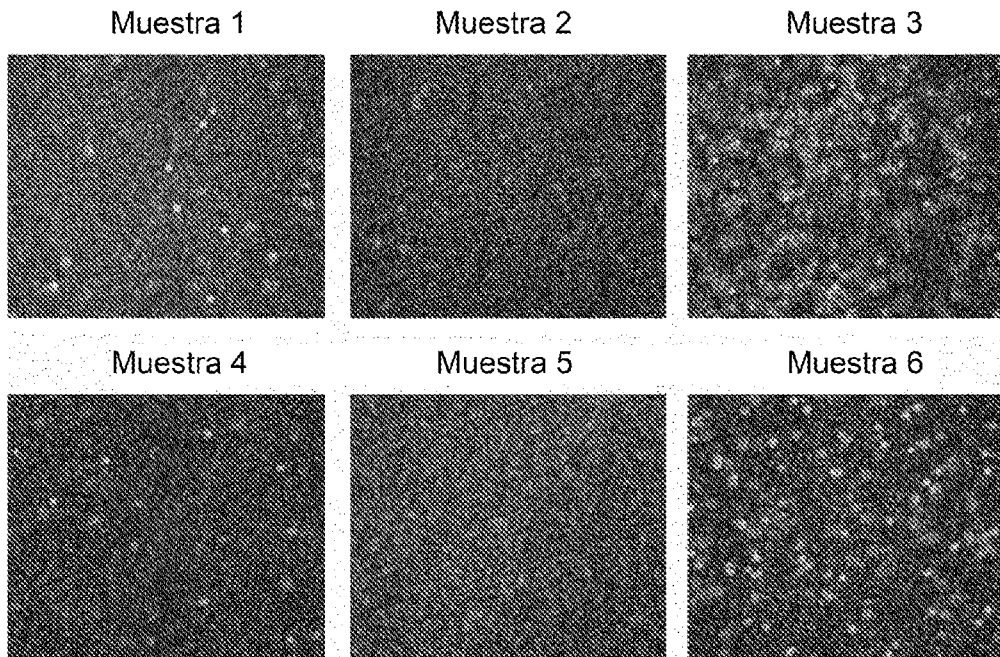


FIG. 8

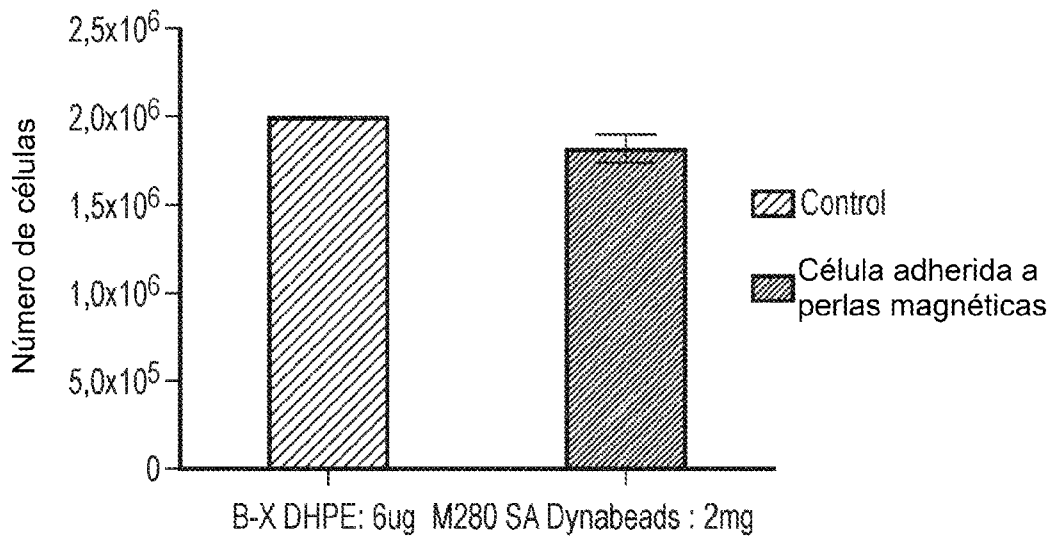


FIG. 9

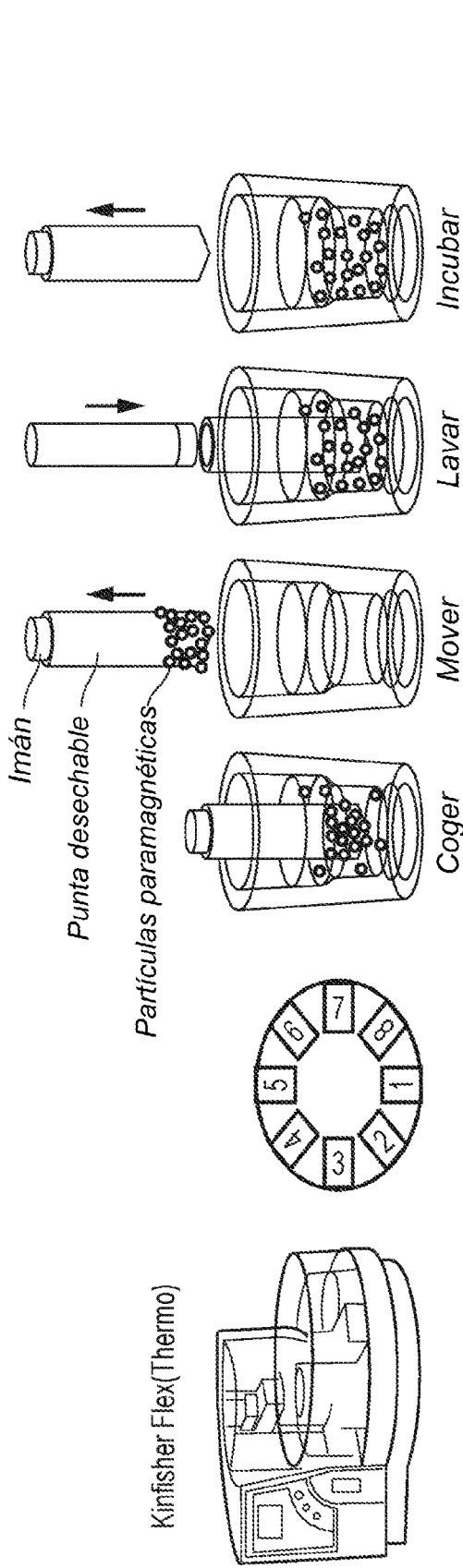


Tabla Descripción general del procedimiento de selección automatizada usando una célula biotinilada (o PDC) en un Kingfisher (24 pocillos profundos)

N.º de placa	Selección ronda 1	Selección ronda 2	Selección ronda 3	Selección ronda 4
1	Placa de células biotiniladas	Placa de células biotiniladas	Placa de células biotiniladas	Placa de células biotiniladas
2	Placa de fagos	Placa de fagos	Placa de fagos	Placa de fagos
3	Placa de lavado 1	Placa de lavado 1	Placa de lavado 1	Placa de lavado 1
4	Placa de lavado 2	Placa de lavado 2	Placa de lavado 2	Placa de lavado 2
5	Eliminación de restos (célula de lisis)	Placa de lavado 3	Placa de lavado 3	Placa de lavado 3
6		Aislamiento de placa de fagos	Aislamiento de placa de fagos	Placa de lavado 4
7	---	Eliminación de restos (célula de lisis)	Eliminación de restos (célula de lisis)	Aislamiento de placa de fagos
8	---	---	---	Eliminación de restos (célula de lisis)
Tiempo total	~110min	~120min	~120min	~130min

FIG. 10

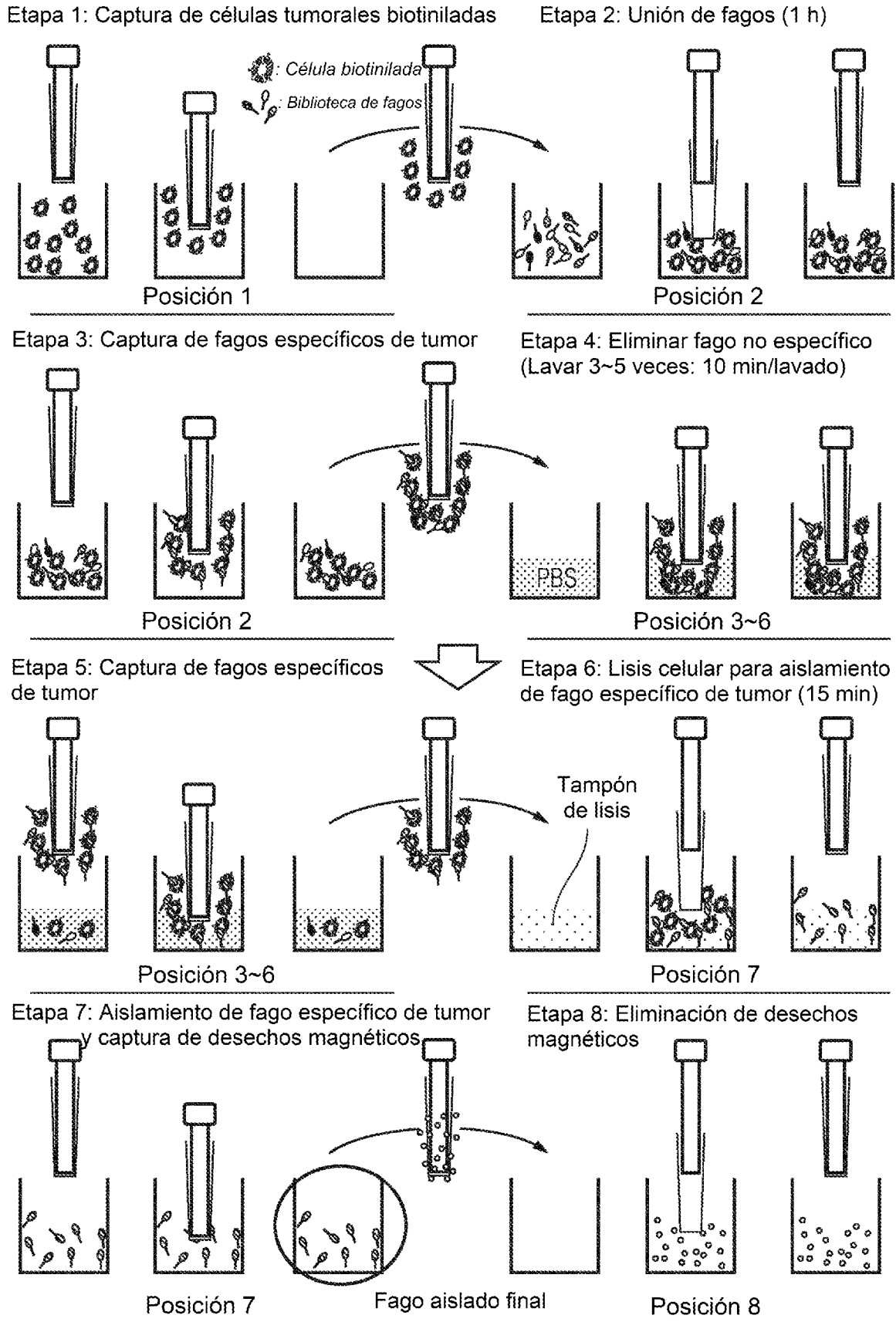


FIG. 11

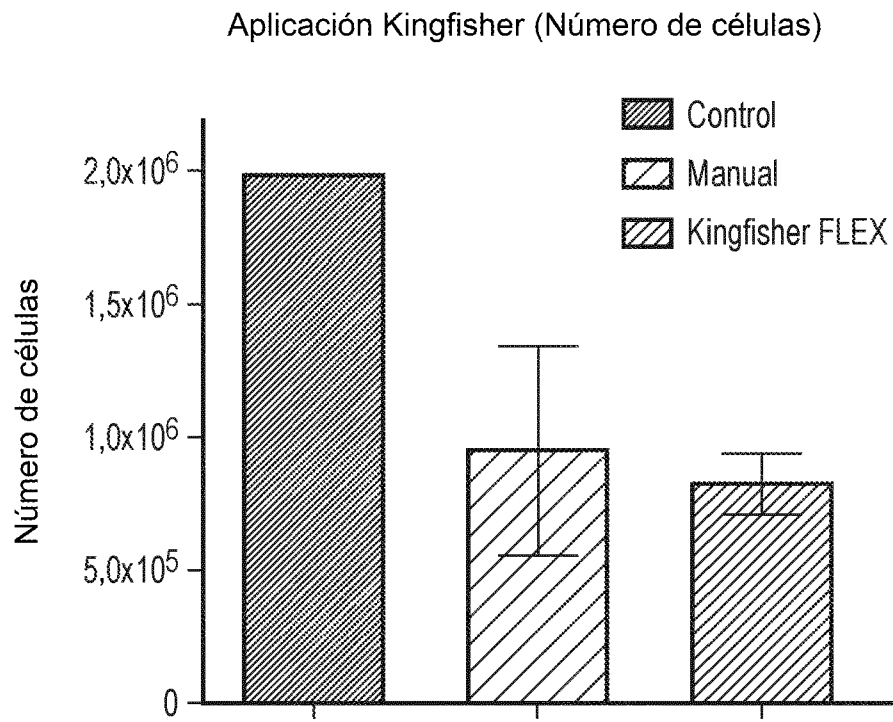


FIG. 12

Información de reactivos

Inicio				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
-	-	-	-	
desecho				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
desecho	1000	-	Reactivo	
Placa de fagos				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
reserva de fagos	1000	-	Reactivo	
Lavado 1				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
PBS	1000	-	Reactivo	
Lavado 2				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
PBS	1000	-	Reactivo	
Lavado 3				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
PBS	1000	-	Reactivo	
Placa de elución				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
Tampón elución (tampón de bajo pH)	1000	-	Reactivo	
Placa de lisis celular				Placa 24 DW
Nombre	Volumen de pocillo [μl]	Volumen de reactivo total [μl]	Tipo	
Trietilamina 100 mM (o Lisis-M)	500	-	Reactivo	

FIG. 13A

Datos de etapas











	Punta1	Peine de puntas de 24 DW
	Recoger	Inicio
	Unión de fagos 15 min	Placa de fagos
	Comienzo de la etapa	Recogida previa No Liberar perlas Si
	Mezcla calentamiento	Tiempo mezcla, velocidad 00:15:00, Lenta Calentamiento durante mezcla No
	Final de la etapa	Mezcla posterior No Recoger perlas No
	Unión de fagos 15 min-2	Placa de fagos
	Comienzo de la etapa	Recogida previa No Liberar perlas Si
	Mezcla calentamiento	Tiempo mezcla, velocidad 00:15:00, Media Calentamiento durante mezcla No
	Final de la etapa	Mezcla posterior No Recoger perlas No
	Unión de fagos 15 min-3	Placa de fagos
	Comienzo de la etapa	Recogida previa No Liberar perlas Si
	Mezcla calentamiento	Tiempo mezcla, velocidad 00:15:00, Lenta Calentamiento durante mezcla No
	Final de la etapa	Mezcla posterior No Recoger perlas No
	Unión de fagos 15 min-4	Placa de fagos
	Comienzo de la etapa	Recogida previa No Liberar perlas Si
	Mezcla calentamiento	Tiempo mezcla, velocidad 00:15:00, Media Calentamiento durante mezcla No
	Final de la etapa	Mezcla posterior No Recoger perlas No
	Recoger perlas 2-1	Placa de fagos
		Recuento de recogida 1 Tiempo de recogida [s] 30
	Liberar perlas 2-1	Lavado 1
		Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Lenta
	Recoger perlas 2-2	Placa de fagos
		Recuento de recogida 1 Tiempo de recogida [s] 30
	Liberar perlas 2-2	Lavado 1
		Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media

FIG. 13B

ES 3 013 122 T3













	Recoger perlas 2-3	Placa de fagos	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 2-3	Lavado 1	
		Tiempo liberación, velocidad	00:01:00, Lenta
	Recoger perlas 2-4	Placa de fagos	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 2-4	Lavado 1	
		Tiempo liberación, velocidad	00:01:00, Media
	Recoger perlas 2-5	Placa de fagos	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 2-5	Lavado 1	
		Tiempo liberación, velocidad	00:01:00, Lenta
	Recoger perlas 3-1	Lavado 1	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 3-1	Placa de elución	
		Tiempo liberación, velocidad	00:01:00, Media
	Recoger perlas 3-2	Lavado 1	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 3-2	Placa de elución	
		Tiempo liberación, velocidad	00:01:00, Media
	Recoger perlas 3-3	Lavado 1	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 3-3	Placa de elución	
		Tiempo liberación, velocidad	00:01:00, Media

FIG. 13B (Continuación)

ES 3 013 122 T3












	Recoger perlas 3-4	Lavado 1		
			Recuento de recogida	1
			Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 3-4	Placa de elución		
			Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Recoger perlas 3-5	Lavado 1		
			Recuento de recogida	1
			Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 3-5	Placa de elución		
			Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Elución	Placa de elución		
	Comienzo de la etapa	Recogida previa	No	
		Liberar perlas	Sí	
	Mezcla calentamiento	Tiempo mezcla, velocidad	00:10:00, Media	
		Calentamiento durante mezcla	No	
	Final de la etapa	Mezcla posterior	No	
		Recoger perlas	No	
	Recoger perlas 4-1	Placa de elución		
			Recuento de recogida	1
			Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 4-1	Placa de lisis celular		
			Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Recoger perlas 4-2	Placa de elución		
			Recuento de recogida	1
			Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 4-2	Placa de lisis celular		
			Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Recoger perlas 4-3	Placa de elución		
			Recuento de recogida	1
			Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 4-3	Placa de lisis celular		
			Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	

FIG. 13B (Continuación)

ES 3 013 122 T3













	Recoger perlas 4-4	Placa de elución	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 4-4	Placa de lisis celular	
		Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Recoger perlas 4-5	Placa de elución	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 4-5	Placa de lisis celular	
		Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Etapa de lisis	Placa de lisis celular	
	Comienzo de la etapa	Recogida previa	No
		Liberar perlas	Sí
	Mezcla calentamiento	Tiempo mezcla, velocidad	00:15:00, Rápida
		Calentamiento durante mezcla	No
	Final de la etapa	Mezcla posterior	No
		Recoger perlas	No
	Recoger perlas 1-desechos	Placa de lisis celular	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 1-desechos	desechos	
		Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Recoger perlas 2-desechos	Placa de lisis celular	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	27
	Liberar perlas 2-desechos	desechos	
		Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Recoger perlas 3-desechos	Placa de lisis celular	
		Recuento de recogida	1
		Tiempo de recogida [s]	30
	Liberar perlas 3-desechos	desechos	
		Tiempo liberación, velocidad 00:01:00, Media	
	Dejar	Inicio	

FIG. 13B (Continuación)

(A)

Resultados de la selección de las células adheridas a perlas magnéticas usando el grupo de fagos obtenidos mediante la 4.^a ronda de fijación de proteínas recombinantes (inmunotubo)

[Baja condición de lavado]

		PDC N.º 1
1. ^a ronda de selección celular automatizada	entrada	1,95E+11
	salida	1,88E+07
	relación	9,64E-05

[Alta condición de lavado]

		PDC N.º 1
1. ^a ronda de selección celular automatizada	entrada	4,90E+11
	salida	1,30E+06
	relación	2,65E-06

(B)

Resultados de la selección automatizada de las células adheridas a perlas magnéticas usando el grupo de fagos obtenidos mediante la 4.^a ronda de selección automatizada usando proteína recombinante adherida a perlas magnéticas

[Baja condición de lavado]

		PDC N.º 1
1. ^a ronda de selección celular automatizada	entrada	1,83E+12
	salida	5,61E+07
	relación	3,07E-05

FIG. 14

(A)

Resultados de la selección de las células adheridas a perlas magnéticas usando el grupo de fagos obtenidos mediante la 4.^a ronda de fijación de proteínas recombinantes (inmunotubo)

Célula	Condición de lavado	Cribado	Clones positivos	Secuencias novedosas
PDC N.º 1	Baja	188	3	2
PDC N.º 1	Alta	184	4	3

(B)

Resultados de la selección automatizada de las células adheridas a perlas magnéticas usando el grupo de fagos obtenidos mediante la 4.^a ronda de selección automatizada usando proteína recombinante adherida a perlas magnéticas

Célula	Condición de lavado	Cribado	Clones positivos	Secuencias novedosas
PDC N.º 1	Baja	94	2	2

FIG. 15

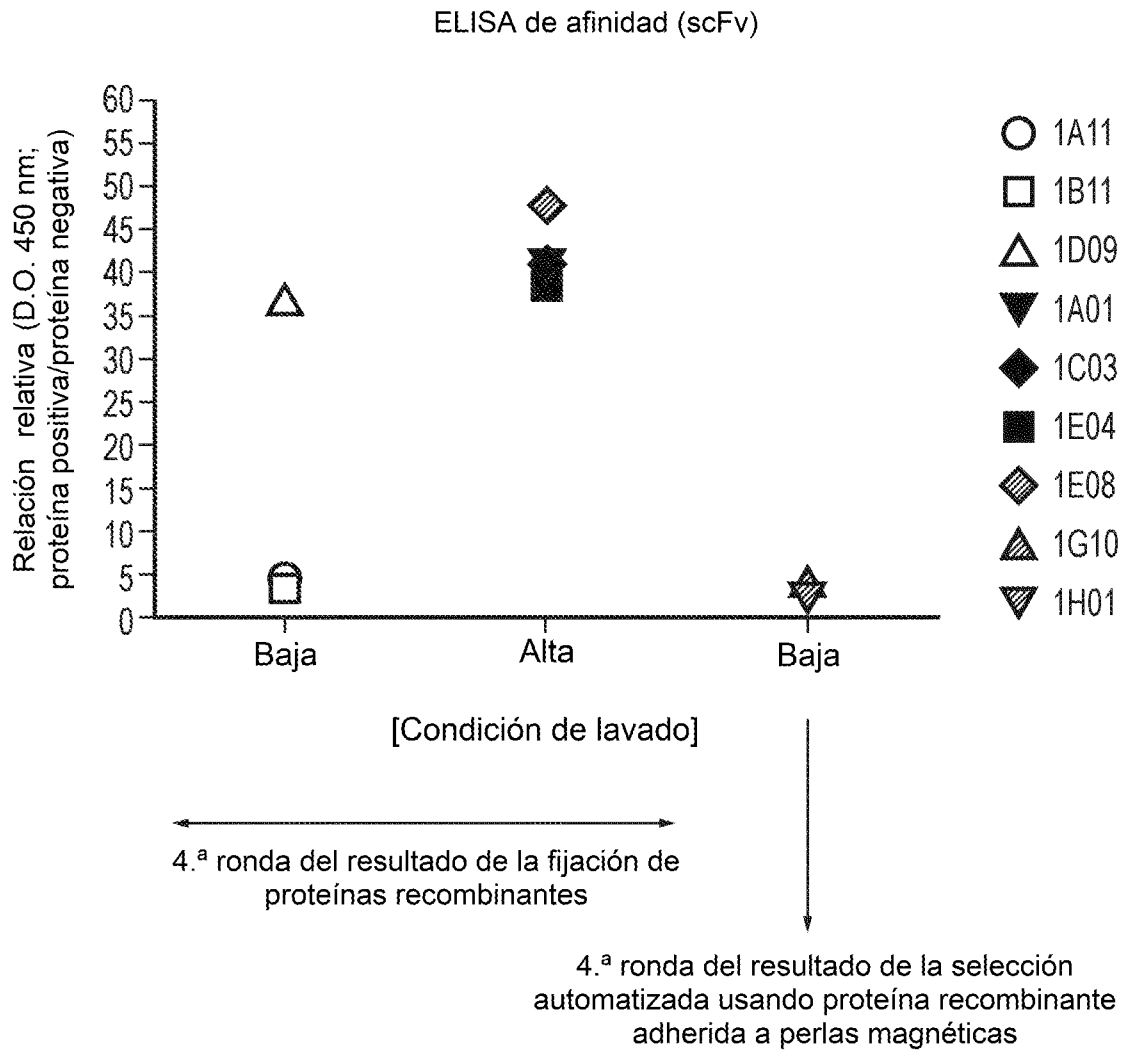


FIG. 16