

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 985**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/37** (2006.01)  
**C12Q 1/25** (2006.01)  
**C12Q 1/34** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**A61K 38/36** (2006.01)  
**A61K 38/39** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61M 37/00** (2006.01)  
**A61K 9/70** (2006.01)  
**B82Y 5/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2014 PCT/US2014/041370**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14197840**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2014 E 14808260 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 3004374**

54 Título: **Detección basada en la afinidad de biomarcadores sintéticos codificados por ligando**

30 Prioridad:

**07.06.2013 US 201361832766 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2021**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)  
77 Massachusetts Avenue  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**BHATIA, SANGEETA, N.;  
WOOD, DAVID K.;  
KWONG, GABRIEL, A.;  
WARREN, ANDREW, D. y  
LIN, KEVIN, Y.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 828 985 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

Detección basada en la afinidad de biomarcadores sintéticos codificados por ligando

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y a productos asociados a detectar y a monitorizar la actividad de proteasas *in vivo* usando ensayos de afinidad. Estos métodos y productos forman la base de y se pueden usar como una plataforma de diagnóstico ultrasensible. La invención también se refiere a productos, kits y bases de datos para su uso en los métodos de la invención.

## Antecedentes de la invención

La orina tiene una historia clínica antigua y de larga duración como una fuente para monitorizar el desarrollo de afecciones y sigue siendo un componente integral de un examen médico. <sup>[1]</sup>Se pueden realizar mucho más de cien pruebas para indicar afecciones tan diversas como embarazo, <sup>[2]</sup> diabetes, <sup>[3]</sup> enfermedades renales, <sup>[4]</sup> trastornos metabólicos y otras. Inspirados por la elegante fisiología del sistema renal -que ha desarrollado la capacidad para filtrar selectivamente litros de sangre en minutos para retirar subproductos de procesos biológicos-, los presentes inventores desarrollaron recientemente una clase de nanopartículas sensibles a las proteasas, llamadas 'biomarcadores sintéticos', que en respuesta a la actividad desregulada de las proteasas en los sitios de enfermedad, liberan indicadores en la circulación que luego se concentran en la orina del hospedador para la monitorización no invasiva, usando técnicas de multiplexado tales como espectrometría de masas para la detección. <sup>[6]</sup>La desregulación de las proteasas en el cáncer tiene importantes consecuencias en la señalización de las células y ayuda a conducir la proliferación de células cancerosas, invasión, angiogénesis, evitación de la apoptosis y metástasis. En modelos murinos de fibrosis hepática y cáncer, los biomarcadores urinarios sintéticos eliminaron la necesidad de la monitorización invasiva de órganos sólidos por biopsias con aguja gruesa, y mejoraron significativamente la detección en la etapa temprana del cáncer en comparación con un biomarcador de la sangre secretado por el tumor.

## Sumario de la invención

La invención es como se describe en las reivindicaciones. La invención en términos generales se refiere a nanopartículas de biomarcador y a usos de las mismas, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable por el cual el marcador detectable es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima y en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector; identificar una muestra biológica para la detección del marcador, en donde la muestra biológica está en un sitio del cuerpo que está remoto de un sitio del cuerpo donde el marcador detectable se libera de la nanopartícula de biomarcador; y, analizar la muestra biológica usando un ensayo de captura para detectar la presencia del marcador detectable, en donde la presencia del marcador detectable en la muestra biológica es indicativa de la enzima que está presente en una forma activa dentro del sujeto.

En algunas realizaciones, el ligando de captura se une al dominio susceptible a enzimas. En otras realizaciones, el ligando de detección se une al dominio susceptible a enzimas. El conector puede ser, por ejemplo, un polímero tal como PEG, una proteína, un péptido, un polisacárido, un ácido nucleico, o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el conector es una proteína de 10-100 aminoácidos de longitud. Preferentemente, el conector es GluFib (SEQ ID NO. 1).

El ensayo de captura en algunas realizaciones implica una etapa de detección seleccionada del grupo que consiste en un ELISA, que incluye ELISA fluorescentes, colorimétricos, bioluminiscentes y quimioluminiscentes, una tira reactiva de papel, ensayo fluorescente basado en células y detección sin marcas, tal como resonancia de plasmones superficiales (RPS). El ensayo de captura puede implicar, por ejemplo, la unión del ligando de captura a un agente de afinidad. El ligando de captura en algunas realizaciones es una proteína, péptido, un polisacárido, un ácido nucleico, una molécula fluorescente o una molécula pequeña. Por ejemplo, el ligando de captura puede ser biotina y el agente de afinidad puede ser estreptavidina o el ligando de captura puede ser estreptavidina y el agente de afinidad puede ser biotina. El método de análisis en algunas realizaciones es un método de análisis múltiple.

En algunas realizaciones, el ligando de detección es una proteína, péptido, un polisacárido, un ácido nucleico, una molécula fluorescente o una molécula pequeña. En otras realizaciones, el ligando de detección o el ligando de captura se selecciona del grupo que consiste en Alexa488, TAMRA, DNP, fluoresceína, Oregon Green, Texas Red, dansilo, BODIPY, Alexa405, Cascade Blue, Lucifer Yellow, nitrotirosina, HA-tag, FLAG-tag, His-tag, Myc-tag, V5-tag, S-tag, biotina.

El agente de afinidad se puede seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, perlas magnéticas conjugadas con Abs, proteína o péptidos sobre una columna de afinidad. En algunas realizaciones, el agente de afinidad se inmoviliza sobre una superficie, tal como, por ejemplo, una perla. En otras

realizaciones, el agente de afinidad está en una disolución.

La nanopartícula de biomarcador se puede administrar al sujeto por cualquier vía. Por ejemplo, se puede administrar por vía intravenosa, por vía oral, por vía transdérmica o a través de un implante.

El vehículo en algunas realizaciones es una partícula tal como una nanopartícula, proteína, péptido o un polisacárido o un polímero sintético.

En algunas realizaciones, la enzima es una enzima relacionada con el cáncer. En otras realizaciones, la enzima es una proteasa o una glucosidasa.

El método también puede incluir la etapa de tomar la muestra biológica del sujeto, en donde la muestra biológica es orina, sangre, saliva o secreción mucosa.

En algunas realizaciones se administran al sujeto una pluralidad de nanopartículas de biomarcador que tienen una pluralidad de marcadores detectables susceptibles a enzimas. En otras realizaciones, la nanopartícula de biomarcador tiene una pluralidad de marcadores detectables susceptibles a enzimas. Por ejemplo, la pluralidad de marcadores detectables susceptibles a enzimas, comprenden una pluralidad de ligandos de captura y un único tipo de ligando de detección en algunas realizaciones. La pluralidad de ligandos de captura incluye 2-1.000, 2-100 o 2-10 ligandos de captura diferentes. En otras realizaciones, la pluralidad de marcadores detectables susceptibles a enzimas comprende un único tipo de ligando de captura y una pluralidad de ligandos de detección.

El marcador detectable susceptible a enzimas es susceptible a modificación por una enzima, escisión por una proteasa, o adición de un componente detectable por la enzima asociada a una enfermedad o afección en algunas realizaciones. En otras realizaciones, el marcador detectable susceptible a enzimas es susceptible a modificación por una enzima, escisión por una proteasa, o adición de un componente detectable por la enzima, no asociado a una enfermedad o afección, pero asociado a una afección normal.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es cáncer, enfermedad cardiovascular, artritis, infección viral, bacteriana, parasítica o fúngica, enfermedad de Alzheimer, enfisema, trombosis, hemofilia, accidente cerebrovascular, disfunción orgánica, cualquier afección inflamatoria, enfermedad vascular, enfermedad parenquimal, o un estado farmacológicamente inducido.

En algunas realizaciones, el método implica una etapa de purificación, en donde el marcador detectable se aísla de otros componentes en la muestra biológica.

En otras realizaciones, el método es un método de diagnóstico de una enfermedad en el sujeto y la presencia del marcador detectable en el sujeto es indicativa del sujeto que tiene la enfermedad y la ausencia del marcador detectable en el sujeto es indicativa de que el sujeto no tiene la enfermedad.

En otras realizaciones, el método implica administrar al sujeto un indicador libre para normalizar la señal de detección.

Un método que implican tomar una muestra de orina de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno o una afección, en donde el sujeto se ha administrado con una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable por el cual el marcador detectable es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima y en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector; y, someter la muestra de orina a un método de análisis por un ensayo de captura, en donde el ensayo de captura implica una etapa de afinidad donde un agente de afinidad se une al ligando de captura y una etapa de detección, en donde el ligando de detección se detecta para detectar la presencia del marcador de ligando, y en donde la presencia o ausencia del marcador de ligando en la muestra biológica es indicativa del trastorno o la afección en el sujeto se describe en el presente documento.

La etapa de detección en algunas realizaciones se selecciona del grupo que consiste en un ensayo de ELISA, que incluye ELISA quimioluminiscente y ELISA bioluminiscente, una tira reactiva de papel, ensayo fluorescente basado en células y detección sin marcas, tal como resonancia de plasmones superficiales (RPS). En otras realizaciones, el agente de afinidad se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, perlas magnéticas conjugadas con Abs, proteína o péptidos en una columna de afinidad. En otras realizaciones, el método implica administrar un agente terapéutico al sujeto para tratar el trastorno o la afección.

En el presente documento también se desvela una composición que comprende un parche transdérmico que tiene un compartimento de administración de fármaco, en donde el compartimento de administración de fármaco incluye una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas que es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima

se proporciona. El marcador detectable susceptible a enzimas puede estar comprendido de un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable y en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector.

También se describe en el presente documento un reactivo. El reactivo incluye una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable por el cual el marcador detectable es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima y en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector.

En algunas realizaciones, el ligando de captura se une al dominio susceptible a enzimas y en otras realizaciones, el ligando de detección se une al dominio susceptible a enzimas. El ensayo de captura puede implicar la unión del ligando de captura a un agente de afinidad.

También se describe en el presente documento una composición. La composición incluye una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas que es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima y un indicador libre. El marcador detectable susceptible a enzimas puede comprender un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable y en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector. En algunas realizaciones, el indicador libre es una proteína, péptido o polisacárido.

También se describe un kit que tiene un recipiente que aloja una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable por el cual el marcador detectable es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima y en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector; e instrucciones para administrar la nanopartícula a un sujeto y para analizar una muestra biológica del sujeto para detectar la presencia o ausencia del marcador de ligando generado por la administración de la nanopartícula por un ensayo de captura.

En algunas realizaciones, el kit incluye además uno o más recipientes que alojan un indicador libre, un agente de afinidad, tal como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, perlas magnéticas conjugadas con Abs, proteínas o péptidos en una columna de afinidad, y un reactivo de detección tal como un reactivo para un ensayo seleccionado del grupo que consiste en un ensayo de ELISA, que incluye ELISA quimioluminiscente y ELISA bioluminiscente, una tira reactiva de papel, ensayo fluorescente basado en células y detección sin marcas, tal como resonancia de plasmones superficiales (RPS).

También se desvela un método que implica administrar a un sujeto una microdosis de una nanopartícula de biomarcador, en donde un marcador detectable se libera de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima; y analizar una muestra biológica usando un ensayo de captura para detectar la presencia del marcador detectable, en donde la presencia del marcador detectable en la muestra biológica es indicativa de la enzima que está presente en una forma activa dentro del sujeto. En algunas realizaciones, la microdosis es inferior a 100 microgramos. En otras realizaciones, la muestra biológica está en un sitio del cuerpo que está remoto de un sitio del cuerpo donde el marcador detectable se libera de la nanopartícula de biomarcador, tal como orina. En aún otras realizaciones, la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido al marcador detectable. Opcionalmente, el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector.

También se describe una composición para cualquiera de los usos descritos en el presente documento. La composición es cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, por ejemplo, una microdosis de una nanopartícula de biomarcador que tiene un marcador detectable, o una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas que es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima y un indicador libre.

Cada una de las divulgaciones y realizaciones de la invención puede englobar diversas relaciones hechas en el presente documento. Se anticipa, por tanto, que cada una de las relaciones que implican un elemento cualquiera o combinaciones de elementos se puede incluir, opcionalmente, en cada divulgación o aspecto de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A-D** muestra (A) el esquema del enfoque. Biomarcadores sintéticos compuestos de NG conjugados con un sustrato sensible a la trombina en tándem con un indicador codificado por ligando. Estos agentes estudian

la vasculatura para la formación de coágulos de sangre donde la actividad de la trombina escinde y libera los indicadores en la orina para el análisis por ELISA. (B) Esquema del ensayo fluorogénico de NG para detectar la actividad de proteasas. (C) Cinética de la actividad fluorogénica en respuesta a proteasas de la coagulación (n=3 por condición). Tr, trombina; Bival, bivalirudina. (D) Cinética de actividad fluorogénica en plasma después de la

adición de CaCl<sub>2</sub> para activar la coagulación (n = 3 por condición). Las **Figuras 2A-D** muestran la detección de los indicadores codificados por ligando por ELISA. (A) Diseño de los indicadores codificados por ligando R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> junto con estructuras químicas de ligandos asociados. (B) Esquema del complejo de sándwich de ELISA y fotografía de placas de 96 pocillos reveladas que muestran la detección específica de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> enriquecidos en muestras de orina de control. (C) Valores de absorbancia ( $\lambda$  = 450 nm) de pocillos recubiertos con anticuerpos anti-Flsc usados para detectar diluciones sucesivas de R<sub>1</sub>, R<sub>1</sub> + R<sub>2</sub> y R<sub>2</sub> en orina (n = 3 por condición, d.e.). (D) Cuantificación del nivel de indicadores escindidos (R<sub>1</sub>) liberados de NG después de la incubación con concentraciones crecientes de trombina (n = 3 por condición, d.e.).

Las **Figuras 3A-D** muestran la caracterización de la trombosis inducida por tromboplastina. (A) Barridos fluorescentes de infrarrojos cercano de órganos extirpados para monitorizar la deposición de fibrinógeno marcado con VT750 tras la inyección intravenosa de tromboplastina (2  $\mu$ g de p.c.) o PBS. (B) Cuantificación del nivel de VT750-fibrina (fibrinógeno) depositado en órganos recogidos de ratones con trombosis y de control (\**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01, \*\*\**P* < 0,005, prueba de la *t* de Student; n = 3 por grupo, d.e.). (C) Tinción con hematoxilina y eosina de pulmones (barra de escala = 100  $\mu$ m). La flecha azul indica coágulo de fibrina. (D) Cuantificación de la fibrina depositada en los pulmones en respuesta al aumento de dosis de tromboplastina. Bival, bivalirudina (\**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01, \*\*\**P* < 0,005, ANOVA unilateral con prueba posterior de Tukey; n = 3-5 ratones, e.e.).

Las **Figuras 4A-E** muestran la detección urinaria no invasiva de embolia pulmonar. (A) Cuantificación de la distribución de NG marcados con VT750 en órganos extirpados de ratones tratados con tromboplastina o PBS (n = 3 ratones, d.e.). (B) Cuantificación de la señal fluorescente de órganos después de que los ratones se infundieran con mezclas de NG conjugados con sustratos extinguidos (marcados con VT750) y tromboplastina o PBS (\**P* < 0,01, prueba de la *t* de Student; n = 3 ratones, d.e.). El recuadro muestra barridos fluorescentes representativos de los riñones y los pulmones. (C) Imagen fluorescente *in vivo* después de la administración de NG que muestra la elevada señal fluorescente limitada a las vejigas de ratones expuestos a tromboplastina. (D) Niveles de indicador urinario normalizado (R<sub>1</sub>/R<sub>2</sub>) en respuesta a tromboplastina. Bival, bivalirudina (\*\*\**P* < 0,005, ANOVA bilateral con prueba posterior de Bonferroni; n = 5 ratones, e.e.). (E) Gráfico de deposición de VT750-fibrina (fibrinógeno) en pulmones frente a niveles de biomarcador urinario normalizado.

Las **Figuras 5A-C** muestran fotografías de la detección colorimétrica de R<sub>1</sub>, R<sub>1</sub> + R<sub>2</sub> y R<sub>2</sub> enriquecidos en orina usando un (A) anticuerpo de captura anti-Flsc o (B) anti-AF488. (C) Valores de absorbancia de placa de ELISA anti-AF488 de (B), medidas a 450 nm (n = 3 por condición, d.e.).

La **Figura 6** muestra la estructura de biotina-eGvndneeGffsar(K-Flsc)GGfPRSGGGC (SEQ ID NO: 2) conjugado con NG.

La **Figura 7** muestra la tinción con hematoxilina y eosina de secciones de órganos recogidas de ratones 30 minutos después de la administración de tromboplastina (barra de escala = 100  $\mu$ m).

La **Figura 8** muestra barridos fluorescentes de infrarrojos cercano del nivel de VT750-fibrina (fibrinógeno) depositado en los pulmones en respuesta a dosis crecientes de tromboplastina y su inhibición por bivalirudina (Bival).

La **Figura 9** muestra el barrido de infrarrojos cercano de la distribución de VT750-NG en órganos tras la trombosis inducida por tromboplastina.

La **Figura 10** muestra el barrido de infrarrojos cercano de la distribución de VT750-sustrato-indicador (R<sub>1</sub>) en órganos después de la trombosis inducida por tromboplastina.

La **Figura 11** muestra la tinción inmunofluorescente de secciones de pulmón después de la trombosis inducida por tromboplastina. Se muestra la tinción de la deposición de fibrina, acumulación de R<sub>1</sub> y núcleos en el pulmón (barra de escala = 100  $\mu$ m).

Las **Figuras 12A-B** muestran el impacto del estado de hidratación sobre los niveles de indicador urinario. (A) Cuantificación de R<sub>2</sub> en orina de ratones no hidratados frente a hidratados por ELISA (\*\*\**P* < 0,005, prueba de la *t* de Student; n = 5 ratones). (B) Volumen de orina recogido de ratones no hidratados frente a ratones hidratados con 10 % de peso corporal equivalente de PBS inyectados por vía subcutánea, dos horas después de la administración (\*\*\**P* < 0,005, prueba de la *t* de Student; n = 5 ratones).

La **Figura 13** muestra el esquema de una nanopartícula de biomarcador y método de uso de la invención. Se conjugan péptidos en tándem codificados por hapteno con nanopartículas de nanogusano (NG). Cuando se administran por vía intravenosa, estos agentes se acumulan en los sitios de enfermedad y liberan indicadores en la orina para la detección por ensayos de afinidad de bajo coste tales como ELISA o tiras reactivas basadas en papel.

Las **Figuras 14A-D** muestran que nanopartículas sensibles a la proteasa detectan enfermedad de la orina. (A y B) es un conjunto de gráficos que muestran la proteólisis de nanopartículas recubiertas con sustrato de péptido marcado con fluoróforo (A)(B6) específico para trombina o MMP9 (B) (B7), sus d-isómeros resistentes a proteasa (dB6, dB7), y en presencia de inhibidores de la proteasa (argatroban y Marimastat). (C) es un esquema que muestra el método. (D) Obtención de imágenes fluorescentes de animal completo que muestran la acumulación urinaria de péptido escindido en ratones que tienen tumores en los flancos.

Las **Figuras 15A-F** muestran la detección basada en afinidad de biomarcadores urinarios sintéticos. (A) Esquema de anticuerpo y complejo de sándwich de hapteno-indicador y límite inferior de detección que muestra la sensibilidad de pM. (B) Imagen de placa de 96 pocillos revelada que muestra la especificidad de anticuerpos

absorbidos para cuatro indicadores codificados por hapteno distintos. (C) La cuantificación óptica del ensayo en plato reveló una reactividad cruzada despreciable entre pares anticuerpo no relacionado-hapteno. (D) Esquema de un ensayo de flujo lateral basado en papel. (E) Cuantificación del límite inferior de detección de un único indicador sobre papel (arriba) y sus perfiles de intensidad (abajo). (F) Se expone tira reactiva de papel espacialmente codificada a diferentes muestras de orina enriquecidas con un indicador distinto. Las líneas de prueba aparecieron solo en regiones impresas con el anticuerpo específico.

Las Figuras 16A-B muestran que biomarcadores urinarios sintéticos disminuyen la enfermedad. Los análisis de ELISA de las muestras de orina de ratones que recibieron inyecciones de NG mostraron elevados biomarcadores urinarios que detectaron trombosis (A) o cáncer (B) con respecto a controles sanos.

## Descripción detallada de la invención

Se describen en el presente documento ensayos rápidos, simples y fiables para evaluar información sobre un proceso o sistema biológico. Se puede evaluar el estado de las condiciones fisiológicas de un sujeto usando los métodos desvelados identificando propiedades moleculares asociadas a la actividad enzimática. Esto se puede realizar ahora usando los métodos de la invención desvelados en el presente documento en el contexto de ensayos ampliamente disponibles que no son tan restrictivos como la espectrometría de masas. La detección de la actividad enzimática es útil para diagnosticar enfermedades tales como cáncer, trombosis, fibrosis, enfermedad infecciosa, artritis reumatoide y arteriosclerosis, así como para indicadores pronósticos. Los usos también incluyen monitorizar actividades enzimáticas tales como cinasas, fosfatasas, nucleasas, y otras. La respuesta de la mayoría de los cánceres a la intervención médica se monitoriza actualmente por exámenes físicos y diversas modalidades de obtención de imágenes clínicas. Algunos cánceres tales como el cáncer próstata y de ovario se monitorizan usando biomarcadores individuales en la sangre. Dichas técnicas de diagnóstico se logran, por ejemplo, usando detección de fluorescencia de marcadores moleculares que se activan en un estado de enfermedad particular. Ensayos más complejos implican normalmente el uso de tecnología y equipo elaborados, tales como en espectrometría de masas. Así, la tecnología desvelada tiene un amplio intervalo de aplicaciones comerciales en los diagnósticos moleculares (por ejemplo, detección precoz del cáncer), así como aplicaciones en la investigación de ciencias básicas (por ejemplo, perfilar actividades de proteasas). Por ejemplo, una prueba de ELISA para cáncer puede tener aplicaciones clínicas inmediatas para el cribado de etapa temprana o para monitorizar la reaparición. Similarmente, una prueba basada en papel tendría varias aplicaciones comerciales para la monitorización en casa (similar a las pruebas de embarazo en casa), así como para proporcionar diagnósticos de bajo coste para la salud global. En resumen, la presente divulgación permite aplicaciones comerciales descartadas por las actuales tecnologías y métodos.

Empleando la capacidad de las nanopartículas de biomarcador para hacer circular y detectar el microentorno local, los presentes inventores han manipulado biomarcadores sintéticos que pueden detectar actividad enzimática *in vivo* y cuantificar no invasivamente los procesos fisiológicos. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos en el presente documento, se puede evaluar la actividad de la trombina para determinar la cantidad de agregado de coágulos activos. A diferencia de otros sensores de nanopartículas que funcionan introduciendo una señal localizada, [9-10,23] las composiciones detectan la actividad de proteasa liberando indicadores localmente en los sitios de interés, es decir, donde se forman los trombos, pero luego se filtran y se detectan remotamente de la orina. Usando ligandos distintos y sus moléculas de unión relacionadas, también se desarrolló un panel de indicadores heterobifuncionalizados que se pueden detectar usando ensayos tales como los ensayos normalizados en placa de 96 pocillos, que eliminan la necesidad de espectrometría de masas como se describe en el estudio previo de los presentes inventores. [6] Este sistema es fácilmente ampliable incorporando pares adicionales de ligando-agente de captura y es responsable de la detección por otros métodos que incluyen tiras reactivas basadas en papel (ensayos de flujo lateral) en los consultorios médicos, ensayos que incluyen ensayos basados en perlas (por ejemplo, inmunoprecipitación), resonancia de plasmones superficiales, nanoelectrónica (por ejemplo, nanohilos), etc.

Los métodos tienen varias ventajas con respecto a los métodos del estado de la técnica. Por ejemplo, usando los métodos es ahora posible detectar la actividad enzimática en un sujeto vivo con plataformas de detección ultrasensible que permiten la microadministración a un sujeto. Actualmente, se llevan a cabo estudios de microadministración en los que se administran dosis mínimas de fármaco (normalmente, una centésima de la dosis farmacológica hasta un máximo de 100 ug) a sujetos humanos para obtener parámetros básicos tales como eliminación, distribución en órganos, semivida en plasma y otros que no se pueden obtener con modelos animales preclínicos. Son seguros la mayoría de los fármacos administrados a un sujeto o paciente en microdosis. Por consiguiente, se pueden realizar estudios de 'fase 0' con menos reglamentaciones en comparación con los ensayos clínicos guiados por la FDA tradicionales. Con el fin de que los estudios de microadministración sean factibles, sin embargo, se requieren métodos analíticos ultrasensibles para detectar los análisis objetivos. Los métodos proporcionan una plataforma de indicadores codificados por ligando que pueden ser fácilmente detectados por plataformas analíticas ultrasensibles establecidas y emergentes. Incluso el trabajo previo de los inventores que implica métodos de detección basados en espectrometría de masas de actividad enzimática *in vivo* no son lo suficientemente sensibles para la microadministración. Por ejemplo, los métodos basados en espectrometría de masas requieren un nivel basal de 1 mg/kg de dosis para la precisa detección. Los métodos permiten administrar a niveles inferiores a 1/100 de estos niveles basales, así como muy por debajo de 100 microgramos, con resultados extremadamente precisos. Estos resultados son bastante inesperados.

La sensibilidad de los ensayos, en algunos aspectos, se obtiene de una combinación de la estructura única de la

nanopartícula de biomarcador y las técnicas de captura-detección. La estructura de la nanopartícula de biomarcador está compuesta por un núcleo o componente de vehículo que está decorado con un marcador que tiene una estructura que tiene ligandos dobles conectados entre sí por un conector y conectados al vehículo a través de un componente susceptible a enzimas. El marcador se escinde y se separa del vehículo por exposición a una enzima funcional *in vivo*. Entonces se desplaza a sitios periféricos del cuerpo tales como la orina, donde se puede capturar y detectar usando las técnicas de la invención. La etapa de captura implica una interacción de unión entre un reactivo de captura y uno de los ligandos. El otro ligando se puede detectar entonces mediante varios métodos. La capacidad para promover la liberación de, y luego la captura y detección del marcador usando ensayos simples fácilmente accesibles, da como resultado las técnicas ultrasensibles descritas en el presente documento.

Actualmente, el detectar las actividades de proteasa en organismos vivos se realiza normalmente con sondas basadas en 'actividad' que se diseñan para emitir señales fluorescentes después de la escisión del péptido (Baruch et al. Trends Cell Biol 2004, Blum et al. Nat Chem Biol 2007, Nomura et al. Nat Rev Cancer 2010). La capacidad de estos agentes para monitorizar los distintos acontecimientos de escisión simultáneamente, o multiplexación, está en parte limitada por los retos del diseño de sus espectros de emisión para que sean distintos y estén dentro de la ventana de infrarrojos cercano (600-900 nm) para minimizar la atenuación de señal de la dispersión de tejido. Sorprendentemente, se ha llevado a cabo la capacidad de manipular cientos de agentes únicamente codificados - y por tanto, muchas pruebas de diagnóstico nuevas - con los métodos desvelados en el presente documento.

Los inventores desarrollaron previamente un método que utilizaba 'códigos de barras' de masa para marcar nanopartículas y permitir la monitorización de la multiplexación de actividades de proteasa por espectrometría de masas. Aunque los modernos espectrómetros de masas pueden detectar fácilmente la presencia de cientos de péptidos únicos dentro de una muestra compleja (es decir, la multiplexación no es una limitación fundamental), estos instrumentos son caros, requieren experiencia técnica específica y no están fácilmente disponibles en la mayoría de las prácticas clínicas. Se descubrió que se podría lograr un sistema basado en nanopartículas para la detección altamente sensible y rápida del estado de enzimas *in vivo* usando ensayos basados en afinidad tales como ELISA y ensayos de flujo lateral (EFL).

Los ensayos de flujo lateral (EFL), también denominados en el presente documento ensayos de tira reactiva de papel, se han usado durante casi 40 años como ha prueba habitual para el embarazo. Una ventaja adicional de los EFL es que no requieren infraestructura de laboratorio. El ensayo se automatiza en la tira reactiva, que solo requiere que el usuario aplique la muestra a la almohadilla de muestra, y los resultados se pueden leer a simple vista por inspección de una tira coloreada distinta. Por estos motivos, los EFL se pueden usar en casi cualquier ámbito. En el mundo desarrollado, una posible implementación incluye una inyección de las nanopartículas de biomarcador en la clínica y luego la medición por el paciente en casa después. Se han desarrollado EFL, o pruebas de diagnóstico rápido PDR, para varias enfermedades, que incluyen malaria y SIDA. Para la mayor parte del mundo en desarrollo, sin embargo, la carga de enfermedades infecciosas está disminuyendo, mientras que están aumentando las enfermedades no contagiosas, tales como el cáncer. Desafortunadamente, los EFL siguen siendo imprecisos para muchas enfermedades debido al bajo nivel de biomarcadores endógenos. Los métodos de la invención, usando un EFL para medir sondas sintéticas sensibles a la proteasa, proporcionan una oportunidad única para diagnosticar el cáncer significativamente antes en sitios como la India y la China rural, donde una ausencia de infraestructura médica haría por lo demás incurable el diagnóstico precoz.

La invención se refiere en términos generales a una plataforma para la caracterización funcional de enfermedad o repertorio enzimático específico de afección como un método para monitorizar tanto la progresión de la enfermedad como la regresión, así como la respuesta a terapéuticos. Los métodos proporcionan más órdenes de magnitud de información enzima-sustrato *in vivo* que las actuales tecnologías o en vista de las técnicas de espectrometría de masas proporcionan métodos más eficientes y más simples. La plataforma proporciona una oportunidad única de monitorizar funcionalmente el cáncer y otra progresión de la enfermedad y respuesta a la terapia. Es particularmente útil para pautas terapéuticas prolongadas, donde el descubrimiento de los distintivos funcionales pronósticos ayudaría enormemente en la intervención y donde los distintivos enzimáticos se correlacionan directamente con la eficacia terapéutica.

Administrando una nanopartícula de biomarcador, tal como una biblioteca detectable de sustratos exógenos en modelos animales de enfermedad, es posible obtener información de las actividades enzimáticas específicas de sustrato asociadas con enfermedades, tales como cáncer, enfermedad cardiovascular, artritis y otras. La tecnología permite el posible perfilado simultáneo de cientos de actividades enzima-sustrato *in vivo* usando, por ejemplo, compuestos detectables sensibles a enzimas chaperonizados, un ejemplo de un compuesto denominado nanopartículas de biomarcador. El método hace uso de la distinta farmacocinética de las estructuras modulares y péptidos marcadores pequeños, opcionalmente hidrófilos (RES y depuración renal, respectivamente). Las nanopartículas de biomarcador tienen largos tiempos de circulación y así permanecen en la circulación o se infiltran en tumores por redes vasculares angiogénicas porosas, tras lo cual las moléculas locales, tales como enzimas (MMP, calicreínas, catepsinas, activadores del plasminógeno, ADAM) acceden a las regiones susceptibles a la enzima de las nanopartículas de biomarcador o los sustratos acceden a las enzimas de las nanopartículas de biomarcador.

Cuando las nanopartículas de biomarcador, por ejemplo, los reactivos que incluyen un dominio susceptible a enzimas,

se exponen a las enzimas, por ejemplo, proteasas, el reactivo se escinde, de forma que se libera un marcador, denominado en el presente documento un marcador detectable susceptible a enzimas. El marcador se elimina por los riñones y así funciona como un "mensajero" de la actividad enzimática. Los análisis de orina pueden generar datos que se organizan en un código de barras de, por ejemplo, actividad enzimática del cáncer. En ausencia de actividad enzimática, las nanopartículas de biomarcador siguen sin escindirse y todo el reactivo que incluye el marcador detectable se elimina a través de los órganos RES (hígado, bazo y ganglios linfáticos) sin producir marcadores de la orina. El uso de los ensayos de captura para identificar sustratos permite la capacidad de multiplexación sin precedentes combinada con la accesibilidad y facilidad de uso, con el potencial de ensayar más de 1.000 sustratos rápidamente y a dosis extremadamente bajas.

Así, se desvela un método de administrar a un sujeto una nanopartícula de biomarcador, identificar una muestra biológica del sujeto en la que detectar el marcador detectable y opcionalmente tomar la muestra; y, someter la muestra biológica a un método de análisis para detectar la presencia de uno o más marcadores detectables. La presencia del marcador detectable en la muestra biológica es indicativa de una enzima activa o un sustrato dentro del sujeto. Aunque los métodos descritos en el presente documento con respecto a un dominio susceptible a enzimas incluyeron el vehículo para detectar la presencia de una enzima *in vivo*, cada uno de los métodos también son útiles cuando se desea detectar un sustrato *in vivo*. En ese caso el dominio susceptible a enzimas contendría una enzima que es capaz de actuar sobre un sustrato *in vivo*, siempre que la reacción enzima-sustrato dé como resultado la liberación del marcador detectable. Por ejemplo, si después de la reacción con un sustrato *in vivo* una enzima experimentara un cambio de conformación que produjera la liberación del marcador detectable, el marcador se podría detectar como una señal de la presencia de sustrato.

Por ejemplo, se describen métodos para administrar a un sujeto una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable por el cual el marcador detectable es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima y en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por un conector; identificar una muestra biológica para la detección del marcador, en donde la muestra biológica está en un sitio del cuerpo que está remoto de un sitio del cuerpo donde el marcador detectable se libera de la nanopartícula de biomarcador; y, analizar la muestra biológica usando un ensayo de captura para detectar la presencia del marcador detectable, en donde la presencia del marcador detectable en la muestra biológica es indicativo de la enzima que está presente en una forma activa dentro del sujeto.

La nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas. Una estructura modular, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que tiene múltiples dominios.

El marcador detectable susceptible a enzimas es una porción de la estructura modular que se conecta al vehículo. Está compuesto por un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable.

El marcador detectable es capaz de ser liberado de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una enzima *in vivo*. El marcador detectable una vez liberado está libre para desplazarse a un sitio remoto para la detección. Un sitio remoto se usa en el presente documento para referirse a un sitio en el cuerpo que es distinto del tejido corporal que aloja la enzima donde ocurre la reacción enzimática. El marcador detectable está compuesto por un ligando de captura y un ligando de detección conectado por un conector.

El ligando de captura es una molécula que es capaz de ser capturada por un componente de unión. El ligando de detección es una molécula que es capaz de ser detectada por cualquiera de varios métodos. Mientras que el ligando de captura y el ligando de detección serán distintos entre sí en un marcador detectable particular, se solapan significativamente la clase de moléculas que proporcionan los ligandos de captura y de detección. Por ejemplo, muchas moléculas son capaces de ser capturadas y detectadas. En algunos casos, estas moléculas se pueden detectar al ser capturadas o capturando una sonda. El ligando de captura y de detección pueden ser cada uno independientemente uno o más de los siguientes: una proteína, un péptido, un polisacárido, un ácido nucleico, una molécula fluorescente, o una molécula pequeña, por ejemplo. En algunas realizaciones, el ligando de detección o el ligando de captura pueden ser, pero no se limitan a, uno de los siguientes: Alexa488, TAMRA, DNP, fluoresceína, Oregon Green, Texas Red, dansilo, BODIPY, Alexa405, Cascada Blue, Lucifer Yellow, nitrotirosina, HA-tag, FLAG-tag, His-tag, Myc-tag, V5-tag, S-tag, biotina o estreptavidina.

El ligando de captura y un ligando de detección están conectados por un conector. El fin del conector es prevenir que impedimento estérico entre los dos ligandos. Así, el conector puede ser cualquier tipo de molécula que logre esto. El conector puede ser, por ejemplo, un polímero tal como PEG, una proteína, un péptido, un polisacárido, un ácido nucleico, o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el conector es una proteína de 10-100 aminoácidos de longitud. Preferentemente, el conector es GluFib (SEQ ID NO. 1). Opcionalmente, el conector puede tener 8 nm-100 nm, 6 nm-100 nm, 8 nm-80 nm, 10 nm-100 nm, 13 nm-100 nm, 15 nm-50 nm o 10 nm-50 nm de longitud.

El dominio de vehículo puede incluir un único tipo de marcador detectable susceptible a enzimas, tal como un único tipo de dominio susceptible a enzimas y o marcador detectable o puede incluir múltiples tipos de marcadores detectables susceptibles a enzimas, tales como diferentes dominios susceptibles a enzimas y marcadores detectables. Por ejemplo, cada vehículo puede incluir 1 tipo de marcador detectable susceptible a enzimas o puede incluir 2-1.000 marcadores detectables susceptibles a enzimas diferentes o cualquier número entero intermedio. Alternativamente, cada vehículo puede incluir más de 1.000 marcadores detectables susceptibles a enzimas. Se administran múltiples copias de la nanopartícula de biomarcador al sujeto. Algunas mezclas de nanopartículas de biomarcador pueden incluir marcadores detectables susceptibles a enzimas que son enzimas, otros pueden ser dominios susceptibles enzimáticos, y otros pueden ser mezclas de los dos. Además, se puede administrar una pluralidad de nanopartículas de biomarcador diferentes al sujeto para determinar si están presentes múltiples enzimas y/o sustratos. En ese caso, la pluralidad de nanopartículas de biomarcador diferentes incluye una pluralidad de marcadores detectables, de forma que cada dominio susceptible a enzimas se asocie con un marcador detectable particular o moléculas.

El dominio de vehículo se puede servir de núcleo de la nanopartícula. Un fin del dominio de vehículo es para servir de plataforma para el marcador detectable susceptible a enzimas. Como tal, el vehículo puede ser cualquier material o tamaño en tanto que pueda servir de un vehículo o plataforma. Preferentemente, el material no es inmunogénico, es decir, no provoca una respuesta inmunitaria en el cuerpo del sujeto al que se administrará. Otro fin es que puede servir de medio de direccionamiento para dirigir la estructura modular a un tejido, célula o molécula. En algunas realizaciones, el dominio de vehículo es una partícula. Una partícula, por ejemplo, una nanopartícula, puede dar como resultado, por ejemplo, el direccionamiento pasivo a tumores por circulación. Otros tipos de vehículos incluyen, por ejemplo, compuestos que provocan el direccionamiento activo a tejido, células o moléculas. Los ejemplos de vehículos incluyen, pero no se limitan a, micropartículas, nanopartículas, aptámeros, péptidos (RGD, iRGD, LyP-1, CREKA, etc.), proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, polímeros, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, herceptina, cetuximab, panitumumab, etc.) y moléculas pequeñas (por ejemplo, erlotinib, gefitinib, sorafenib, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "partícula" incluye nanopartículas, así como micropartículas. Las nanopartículas se definen como partículas de menos de 1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Una preparación de nanopartículas incluye partículas que tienen un tamaño de partículas promedio inferior a 1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las micropartículas son partículas de más de 1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero menos de 1 mm. Una preparación de micropartículas incluye partículas que tienen un tamaño de partículas promedio superior a 1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las micropartículas pueden tener, por tanto, un diámetro de al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 50, o al menos 75 micrómetros, que incluye tamaños en intervalos de 5-10 micrómetros, 5-15 micrómetros, 5-20 micrómetros, 5-30 micrómetros, 5-40 micrómetros, o 5-50 micrómetros. Una composición de partículas puede tener distribuciones de tamaño heterogéneas que varían desde tamaños de 10 nm hasta mm. En algunas realizaciones, el diámetro es aproximadamente 5 nm a aproximadamente 500 nm. En otras realizaciones, el diámetro es aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm. En otra realización, el diámetro es aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm.

Las partículas se pueden componer de varios materiales que incluyen hierro, materiales naturales cerámicos, metálicos, polímeros (incluyendo lípidos, azúcares, quitosano, ácido hialurónico, etc.), materiales de polímero sintético (incluyendo poli-lactida-co-glicolida, poliglicerol sebacato, etc.), y materiales no de polímero, o combinaciones de los mismos.

Las partículas pueden estar compuestas por completo o en parte de polímeros o materiales no de polímero. Los materiales no de polímero se pueden emplear, por ejemplo, en la preparación de las partículas. Los materiales a modo de ejemplo incluyen alúmina, carbonato cálcico, sulfato de calcio, fosfosilicato de calcio, fosfato de sodio, aluminato de calcio, fosfato de calcio, hidroxiapatita, trifosfato de calcio, fosfato de dicalcio, trifosfato de calcio, tetrafosfato de calcio, fosfato de calcio amorfo, octafosfato de calcio y silicatos. En ciertas realizaciones, las partículas pueden comprender una sal de calcio tal como carbonato cálcico, una sal de circonio tal como dióxido de circonio, una sal de cinc tal como óxido de cinc, una sal de magnesio tal como silicato de magnesio, una sal de silicio tal como dióxido de silicio o una sal de titanio tal como óxido de titanio o dióxido de titanio.

Se conocen varios polímeros biocompatibles biodegradables y no biodegradables en el campo de los materiales poliméricos, liberación controlada de fármacos e ingeniería de tejidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 6,123.727; 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404 de Vacanti; las patentes de EE. UU. N° 6.095.148; 5.837.752 de Shastri; la patente de EE. UU. N° 5.902.599 de Anseth; las patentes de EE. UU. N° 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600 de Mikos; la patente de EE. UU. N° 5.399.665 de Barrera; la patente de EE. UU. N° 5.019.379 de Domb; la patente de EE. UU. N° 5.010.167 de Ron; la patente de EE. UU. N° 4.946.929 de d'Amore; y las patentes de EE. UU. N° 4.806.621; 4.638.045 de Kohn; véanse también Langer, Acc. Chem. Res. 33:94, 2000; Langer, J. Control Release 62:7, 1999; y Uhrich et al., Chem. Rev. 99:3181, 1999; todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia).

Los polímeros incluyen, pero no se limitan a: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquilenos), poli(tereftalatos de alquilenos), poli(alcoholes vinílicos), polivinil éteres, poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, celulosa

propionato, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcohol vinílicos), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo) y poliestireno.

Los ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen etileno-acetato de vinilo, poli(ácido (met)acrílico), poliamidas, copolímeros y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(caprolactona), poli(hidroxibutirato), poli(lactida-co-glicolida) y poli(lactida-co-caprolactona) y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones sistemáticamente hechas por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan o por hidrólisis enzimática o por exposición a agua *in vivo*, por erosión superficial o a granel. Los materiales anteriores se pueden usar solos, como mezclas físicas (combinaciones), o como copolímeros. En algunas realizaciones, los polímeros son poliésteres, polianhídridos, poliestirenos, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de ácido láctico y glicólico, y combinaciones de los mismos.

La PVP es un polímero hidrófilo no ionogénico que tiene un peso molecular medio que varía desde aproximadamente 10.000 hasta 700.000 y la fórmula química  $(C_6H_9NO)_n$ . La PVP también se conoce como poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno], Povidone™, Polyvidone™, RP 143™, Kollidon™, Pregel ST™, Periston™, Plasdone™, Plasmosan™, Protagent™, Subtosan™ y Vinisil™. La PVP no es tóxica, es altamente higroscópica y se disuelve fácilmente en agua o disolventes orgánicos.

El polietilenglicol (PEG), también conocido como poli(oxietilen)glicol, es un polímero de condensación de óxido de etileno y agua que tiene la fórmula química general  $HO(CH_2CH_2O)_nH$ .

El poli(alcohol vinílico) (PVA) es un polímero preparado a partir de poli(acetatos de vinilo) por sustitución de los grupos acetato con grupos hidroxilo y tiene la fórmula  $(CH_2CHOH)_n$ . La mayoría de los poli(alcoholes vinílicos) son solubles en agua.

PEG, PVA y PVP están comercialmente disponibles de proveedores químicos tales como Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.).

En ciertas realizaciones, las partículas pueden comprender poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).

El vehículo puede estar compuesto de materiales inorgánicos. Los materiales inorgánicos incluyen, por ejemplo, materiales magnéticos, materiales conductores y materiales semiconductores.

Además de las partículas, el vehículo se puede componer de cualquier vehículo orgánico, que incluye vehículos biológicos y vivos tales como células, virus, bacterias, así como cualquier vehículo orgánico no vivo, o cualquier composición que permita la exposición de los sustratos enzimáticos a enzimas en enfermedad (incluyendo enzimas extracelulares, unidas a la membrana e intracelulares).

En algunas realizaciones, las partículas son porosas. Una partícula porosa puede ser una partícula que tiene uno o más canales que se extienden desde su superficie externa en el núcleo de la partícula. En algunas realizaciones, el canal se puede extender a través de la partícula de forma que sus extremos estén ambos situados en la superficie de la partícula. Estos canales se forman normalmente durante la síntesis de la partícula por inclusión, seguido por retirada de un reactivo que forma canales en la partícula.

El tamaño de los poros puede depender del tamaño de la partícula. En ciertas realizaciones, los poros tienen un diámetro inferior a 15 micrómetros, inferior a 10 micrómetros, inferior a 7,5 micrómetros, inferior a 5 micrómetros, inferior a 2,5 micrómetros, inferior a 1 micrómetro, inferior a 0,5 micrómetros o inferior a 0,1 micrómetros. El grado de porosidad en las partículas porosas puede variar de más de 0 a menos de 100 % del volumen de partícula. El grado de porosidad puede ser inferior a 1 %, inferior a 5 %, inferior a 10 %, inferior a 15 %, inferior a 20 %, inferior a 25 %, inferior a 30 %, inferior a 35 %, inferior a 40 %, inferior a 45 % o inferior a 50 %. El grado de porosidad se puede determinar de varias formas. Por ejemplo, el grado de porosidad se puede determinar basándose en el protocolo de síntesis de los vehículos (por ejemplo, basado en el volumen de la disolución acuosa u otro reactivo que forma los canales) o por inspección microscópica de los vehículos después de la síntesis.

La pluralidad de partículas puede ser homogénea para uno o más parámetros o características. Una pluralidad que es homogénea para un parámetro dado, en algunos casos, significa que las partículas dentro de la pluralidad se desvían

entre sí no más de aproximadamente  $\pm 10\%$ , preferentemente no más de aproximadamente  $\pm 5\%$ , y lo más preferentemente no más de aproximadamente  $\pm 1\%$  de una medida cuantitativa dada del parámetro. Como un ejemplo, las partículas pueden ser homogéneamente porosas. Esto significa que el grado de porosidad dentro de las partículas de la pluralidad se diferencia en no más de  $\pm 10\%$  de la porosidad promedio. En otros casos, una pluralidad que es homogénea significa que todas las partículas en la pluralidad se trataron o procesaron del mismo modo, que incluye, por ejemplo, exposición al mismo agente independientemente de si cada partícula, en último lugar, tiene todas las mismas propiedades. En otras realizaciones más, una pluralidad que es homogénea significa que al menos  $80\%$ , preferentemente al menos  $90\%$  y más preferentemente al menos  $95\%$  de las partículas son idénticas para un parámetro dado.

La pluralidad de partículas puede ser heterogénea para uno o más parámetros o características. Una pluralidad que es heterogénea para un parámetro dado significa, en algunos casos, que las partículas dentro de la pluralidad se desvían del promedio en más de aproximadamente  $\pm 10\%$ , que incluye más de aproximadamente  $\pm 20\%$ . Las partículas heterogéneas se pueden diferenciar con respecto a varios parámetros que incluyen su tamaño o diámetro, su forma, su composición, su carga superficial, su perfil de degradación, si y qué tipo de agente comprende la partícula, la localización de dicho agente (por ejemplo, sobre la superficie o internamente), el número de agentes comprendidos por la partícula, etc. Se contemplan síntesis separadas de diversos tipos de partículas que entonces se combinan en una cualquiera de varias relaciones predeterminadas antes del contacto con la muestra. Como un ejemplo, en una realización, las partículas pueden ser homogéneas con respecto a la forma (por ejemplo, al menos  $95\%$  son de forma esférica), pero pueden ser heterogéneas con respecto al tamaño, perfil de degradación y/o agente comprendido en su interior.

También se pueden controlar el tamaño de partículas, la forma y la cinética de liberación ajustando las condiciones de formación de partículas. Por ejemplo, se pueden optimizar las condiciones de formación de partículas para producir partículas más pequeñas o más grandes, o se puede aumentar el tiempo de incubación total o la temperatura de incubación, dando como resultado partículas que tienen cinética de liberación prolongada.

Las partículas también se pueden recubrir con una o más sustancias estabilizantes, que pueden ser particularmente útiles para la liberación a largo plazo con la administración parenteral o para administración oral permitiendo el paso de las partículas a través del estómago o intestino sin disolución. Por ejemplo, las partículas previstas para administración oral se pueden estabilizar con un recubrimiento de una sustancia tal como mucina, una secreción que contiene mucopolisacáridos producidos por las células caliciformes del intestino, las glándulas submaxilares y otras células glandulares de la mucosa.

Para potenciar la administración, las partículas se pueden incorporar, por ejemplo, en liposomas, virosomas, lípidos catiónicos u otras estructuras basadas en lípidos. El término "lípidos catiónicos" se refiere a lípidos que llevan una carga positiva neta a pH fisiológico. Dichos lípidos incluyen, pero no se limitan a, DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Chol y DMRIE. Además, están disponibles varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos. Estos incluyen, por ejemplo, LIPOFECTIN® (liposomas catiónicos comercialmente disponibles que comprenden DOTMA y DOPE, de GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y., USA); LIPOFECTAMINE® (liposomas catiónicos comercialmente disponibles que comprenden DOSPA y DOPE, de GIBCO/BRL); y TRANSFECTAM® (lípidos catiónicos comercialmente disponibles que comprenden DOGS en etanol de Promega Corp., Madison, Wis., EE. UU.). Están disponibles varios métodos para preparar liposomas, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, 4.946.787; y la publicación PCT N° WO 91/17424. Las partículas también pueden estar compuestas por completo o en parte de componentes GRAS, es decir, los componentes son aquellos que son generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA estadounidense. Los componentes de GRAS útiles como material en partículas incluyen partículas basadas en comida no degradables tales como celulosa.

El dominio de vehículo puede servir a varias funciones. Como se trata anteriormente, puede ser útil para el direccionamiento del producto a una región específica, tal como un tejido. En ese caso podrían incluir un agente de direccionamiento tal como una glucoproteína, un anticuerpo o una proteína de unión.

Además, se puede ajustar el tamaño del dominio de vehículo basándose en el uso particular de la nanopartícula de biomarcador. Por ejemplo, el dominio de vehículo se puede diseñar para tener un tamaño superior a  $5\text{ nm}$ . Las partículas, por ejemplo, de más de  $5\text{ nm}$  no son capaces de entrar en la orina, sino que son eliminadas a través del sistema reticuloendotelial (SER; hígado, bazo y ganglios linfáticos). Al ser excluido de la eliminación a través de los riñones, cualquier nanopartícula de biomarcador no escindida no se detectará en la orina durante la etapa de análisis. Además, partículas más grandes pueden ser útiles para mantener la partícula en la sangre o en un sitio tumoral donde grandes partículas son más fácilmente transportadas a través de la vasculatura. En algunas realizaciones, el dominio de vehículo tiene  $500\text{ micrómetros} - 5\text{ nm}$ ,  $250\text{ micrómetros} - 5\text{ nm}$ ,  $100\text{ micrómetros} - 5\text{ nm}$ ,  $10\text{ micrómetros} - 5\text{ nm}$ ,  $1\text{ micrómetro} - 5\text{ nm}$ ,  $100\text{ nm} - 5\text{ nm}$ ,  $100\text{ nm} - 10\text{ nm}$ ,  $50\text{ nm} - 10\text{ nm}$  o cualquier intervalo de tamaño en número entero intermedio. En otros casos, el dominio de vehículo es más pequeño de  $5\text{ nm}$  en tamaño. En dicho caso, la nanopartícula de biomarcador se eliminará en la orina. Sin embargo, la presencia de marcador detectable libre se puede detectar aún, por ejemplo, usando espectrometría de masas. En algunas realizaciones, el dominio de vehículo tiene  $1 - 5\text{ nm}$ ,  $2 - 5\text{ nm}$ ,  $3 - 5\text{ nm}$  o  $4 - 5\text{ nm}$ .

Opcionalmente, el dominio de vehículo puede incluir un agente biológico. En una realización, un agente biológico se podría incorporar en el dominio de vehículo o puede constituir el dominio de vehículo. Por ejemplo, puede formar el armazón o la plataforma a la que se fija el dominio proteolítico. Así, las composiciones pueden lograr dos fines al mismo tiempo, los métodos de diagnóstico y la administración de un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente biológico puede ser un inhibidor de enzimas. En ese caso, el agente biológico puede inhibir la actividad proteolítica en un sitio local y se puede usar el marcador detectable para probar la actividad de ese terapéutico particular en el sitio de acción. El VIH es un ejemplo de la enfermedad en la que se pueden monitorizar proteasas activas. En esta realización, la composición puede incluir una micropartícula u otro dispositivo de administración que lleva un inhibidor de la proteasa. El sitio susceptible a la proteasa puede ser sensible a las proteasas del VIH de forma que se pueda proporcionar la retroalimentación referente a la actividad del inhibidor particular de la proteasa.

Los agentes biológicos incluyen agentes de diagnóstico, cosméticos y terapéuticos, tales como fármacos liberables. Así, se puede incorporar cualquier agente biológico dentro de las partículas, que se puede administrar o por vía local o por vía sistémica, o mantener los agentes incorporados tras la administración o aplicación a un sujeto. Se puede incorporar cualquier material biocompatible o farmacológicamente aceptable en las partículas o atrapar en los poros de las partículas usando la tecnología conocida por los expertos en la técnica. Los agentes biológicos incluyen, pero no se limitan a, compuestos inorgánicos y orgánicos sintéticos, proteínas y péptidos, polisacáridos y otros azúcares, lípidos y secuencias de ácidos nucleicos de ADN y ARN que tienen actividades terapéuticas, profilácticas, cosméticas o de diagnóstico. Las secuencias de ácidos nucleicos incluyen genes, plásmidos, vectores, moléculas antisentido que se unen a ADN complementario para inhibir la transcripción, ARNip, ARNhp y ribozimas.

En ciertos casos, el agente biológico es un agente antimicrobiano. Un agente antimicrobiano, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que existe de forma natural o sintética que es capaz de destruir o inhibir los microorganismos infecciosos. El tipo de agente antimicrobiano útil según la invención dependerá del tipo de microorganismo con el que el sujeto se infecta o en riesgo de llegar a infectarse. Los agentes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Expresiones tales como "agente antiinfeccioso", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasitario" y "parasitocida" tienen significados bien establecidos para los expertos habituales en la técnica y se definen en textos médicos habituales.

También se pueden incorporar factores de crecimiento en el vehículo. Como se usa en el presente documento, el término factor de crecimiento se refiere a cualquier agente que estimula la proliferación y/o diferenciación celular. Los factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) I y II, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , proteína morfogenética ósea (BMP) (por ejemplo, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 o BMP-7), proteínas hedgehog, factores de diferenciación del crecimiento, factores estimulantes de colonias hematopoyéticas (CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor inductor de osteoide (OIF), angiogeninas, endotelinas, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de queratinocitos, ADMP-1, interleucinas (IL) (por ejemplo, IL-3 e IL-6), factores de crecimiento epiteliales, dexametasona, leptina, sortilina, transglutaminasa, prostaglandina E, 1,25-dihidroxivitamina D3, ácido ascórbico, pro-colágeno, fosfato de glicerol, TAK-778, estatinas, hormona de crecimiento, factor Steel (SF), activina A (ACT), ácido retinoico (RA), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento hepatopoyéticos, factores de crecimiento de péptidos, eritropoyetina, factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN), factor de crecimiento de unión a heparina (HBGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor morfogenético muscular (MMP).

El agente biológico también puede ser una terapia contra el cáncer. Las terapias contra el cáncer incluyen, por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, terapia adyuvante, o cualquier combinación de las anteriormente mencionadas.

El dominio de vehículo también se puede configurar de forma que se pueda detectar en el cuerpo durante el análisis. Por ejemplo, se puede incorporar óxido de hierro en las partículas de manera que la nanopartícula de biomarcador pueda ser seguida usando IRM para proporcionar datos de obtención de imágenes no invasiva.

El vehículo se une al marcador detectable susceptible a enzimas. Un marcador detectable susceptible a enzimas, como se usa en el presente documento, es la porción de la estructura modular que promueve la reacción enzimática en el sujeto, causando la liberación de un marcador detectable. El marcador detectable susceptible a enzimas es un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable.

El sitio susceptible a enzimas depende de enzimas que son activas en un estado de enfermedad específico. Por ejemplo, los tumores se asocian con un conjunto específico de enzimas. Si el estado de enfermedad que se analiza es un tumor, entonces el producto se diseña con un sitio susceptible a enzimas que corresponde al de la enzima expresada por el tumor u otro tejido enfermo. Alternativamente, el sitio específico de enzima se puede asociar a enzimas que están, en general, presentes, pero están ausentes en un estado de enfermedad particular. En este ejemplo, un estado de enfermedad se asociaría a una ausencia o señal asociada a la enzima, o niveles reducidos de señal en comparación con una referencia normal.

Una enzima, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de numerosas proteínas producidas en

células vivas que aceleran o catalizan los procesos metabólicos de un organismo. Las enzimas actúan sobre los sustratos. El sustrato se une a la enzima en una ubicación denominada el sitio activo justo antes de que tenga lugar la reacción catalizada por la enzima. Las enzimas incluyen, pero no se limitan a, proteasas, glucosidasas, lipasas, heparinasas, fosfatasas.

El sitio susceptible a enzimas se puede optimizar para proporcionar tanto alta actividad catalítica (u otra actividad enzimática) para enzimas diana especificadas, pero también para liberar marcadores detectables optimizados para la detección. El desenlace del paciente depende del fenotipo de enfermedades individuales al nivel molecular, y esto se refleja frecuentemente en la expresión de enzimas. La reciente explosión de la bioinformática ha facilitado la exploración de complejos patrones de expresión génica en tejidos humanos (Fodor, S.A. Massively parallel genomics. Science 277, 393-395 (1997)). Recientemente se han desarrollado sofisticados algoritmos informáticos capaces del diagnóstico molecular de tumores usando los inmensos conjuntos de datos generados por el perfilado de expresión (Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. Nat Med 2001;7:673-679). Se puede acceder a esta información para identificar enzimas y sustratos asociados a enfermedades específicas. Basándose en esta información, el experto puede identificar enzimas o sustratos apropiados para incorporar en la nanopartícula de biomarcador. La Tabla 1 proporciona una lista no limitante de enzimas asociadas a enfermedad (ya sea elevada o reducida con respecto a lo normal) y en algunos casos el sustrato específico. La Tabla 2 proporciona una lista no limitante de sustratos asociados a enfermedad u otras afecciones. El experto conoce numerosas otras combinaciones de enzima/sustrato asociadas a enfermedades o afecciones específicas y son útiles según la invención.

Tabla 1

| ENFERMEDAD                                                            | ENZIMA                                                              | SUSTRATO                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cáncer                                                                | MMP                                                                 | colágenos, gelatina, diversas proteínas ECM                                                       |
| Cáncer                                                                | MMP-2                                                               | colágeno de tipo IV y gelatina                                                                    |
| Cáncer                                                                | MMP-9                                                               | colágenos de tipo IV y V y gelatina                                                               |
| Cáncer                                                                | calicreínas                                                         | quininógenos, plasminógeno                                                                        |
| Cáncer                                                                | catepsinas                                                          | amplio espectro de sustratos                                                                      |
| Cáncer                                                                | activador del plasminógeno, tPA                                     | Plasminógeno                                                                                      |
| Cáncer                                                                | ADAM (una desintegrina y metaloproteasa, también MDC, adamalislina) | diversos dominios extracelulares de proteínas transmembranarias                                   |
| Carcinoma pancreático                                                 | MMP-7                                                               | diversos, por ejemplo colágeno 18, FasL, HLE, DCN, IGFBP-3, MAG, plasminógeno, otras MMP          |
| Cáncer pancreático                                                    | ADAM9, ADAM15                                                       | diversos dominios extracelulares de proteínas transmembranarias                                   |
| Adenocarcinoma de próstata                                            | Matriptasa, una serina proteasa transmembranaria de tipo II         | inespecífico, se escinde después de restos Lys o Arg                                              |
| Cáncer de próstata                                                    | Calicreína 3                                                        | quininógenos, plasminógeno                                                                        |
| Cáncer de próstata                                                    | ADAM 15                                                             | diversos dominios extracelulares de proteínas transmembranarias                                   |
| Carcinoma de ovario                                                   | Calicreína 6                                                        | quininógenos, plasminógeno                                                                        |
| Tumores derivados del epitelio (mama, próstata, ovario, colon, bucal) | Matriptasa, una serina proteasa transmembranaria de tipo II         | inespecífico, se escinde después de restos Lys o Arg                                              |
| Cáncer de ovario                                                      | MMP-2, MMP-9, calicreína-10 (hk-10)                                 | colágenos de tipo IV y V y gelatina, quininógenos, plasminógeno                                   |
| Cáncer de mama, gástrico, próstata                                    | catepsinas B, L y D                                                 | amplio espectro de sustratos                                                                      |
| Cáncer endometrial                                                    | catepsina B                                                         | escisión inespecífica de un amplio espectro de sustratos sin una clara especificidad de secuencia |
| Adenocarcinoma esofágico                                              | catepsina B                                                         | escisión inespecífica de un amplio espectro de sustratos sin una clara especificidad de secuencia |

(continuación)

| ENFERMEDAD                                              | ENZIMA                                                                                                                                                                                                        | SUSTRATO                                                           |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Cánceres invasivos, metástasis                          | serina proteasas integrales de tipo II (dipeptidil peptidasa IV (DPP4/CD26), activación de seprasa/fibroblasto proteína alfa (FAPalfa) y prolil serina peptidasas transmembranarias de tipo II relacionadas)) |                                                                    |
| Cánceres invasivos, metástasis                          | Seprasa                                                                                                                                                                                                       | diversas proteínas ECM                                             |
| Infecciones virales                                     |                                                                                                                                                                                                               |                                                                    |
| Todos los retrovirus                                    | proteasa viral                                                                                                                                                                                                | fusión de GagPol precursora                                        |
| VIH                                                     | proteasa del VIH (PR del VIH, una proteasa aspártica)                                                                                                                                                         | proteínas Gag y GagPol precursoras                                 |
| Hepatitis C                                             | Serina proteasa NS3                                                                                                                                                                                           | poliproteína de precursores virales                                |
| Dengue                                                  | Proteasa del dengue                                                                                                                                                                                           | autoescisión (NS2B/NS3), escisión de NS3/NS4A y NS4B/NS5           |
| Nilo occidental                                         | NS2B/NS3pro                                                                                                                                                                                                   | poliproteína precursora viral                                      |
| Infecciones bacterianas                                 |                                                                                                                                                                                                               |                                                                    |
| Legionella spp.                                         | metaloproteasa de cinc                                                                                                                                                                                        | Me-Arg-Pro-Tyr                                                     |
| Meningoencefalitis                                      | cisteína proteasa histolítica                                                                                                                                                                                 |                                                                    |
| Streptococcus pyogenes (Streptococcus del grupo A)      | exotoxina B pirogénica estreptocócica (SpeB)                                                                                                                                                                  | matriz extracelular, inmunoglobulinas, componentes del complemento |
| Clostridium difficile                                   | Cwp84                                                                                                                                                                                                         | fibronectina, laminina, vitronectina y otras proteínas de ECM      |
| Enfermedad de Alzheimer                                 | BACE-1.2 (secretasa de Alzheimer)                                                                                                                                                                             | proteína precursora de $\beta$ -amiloide                           |
| Accidente cerebrovascular y recuperación                | MMP, tPA                                                                                                                                                                                                      |                                                                    |
| Enfermedad cardiovascular                               | Enzima convertidora de angiotensina (ACE)                                                                                                                                                                     | angiotensina I, bradiquinina                                       |
| Aterosclerosis                                          | catepsina K, L, S                                                                                                                                                                                             | amplio espectro de sustratos                                       |
|                                                         |                                                                                                                                                                                                               |                                                                    |
|                                                         |                                                                                                                                                                                                               |                                                                    |
| artritis                                                | MMP-1                                                                                                                                                                                                         | colágenos fibrilares helicoidales triples                          |
| artritis reumatoide                                     | trombina                                                                                                                                                                                                      | Osteopontina                                                       |
| osteoartritis                                           | trombina                                                                                                                                                                                                      | Osteopontina                                                       |
| osteoporosis/osteartritis                               | catepsina K, S                                                                                                                                                                                                | amplio espectro de sustratos                                       |
| Artritis, enfermedad inflamatoria de las articulaciones | Agrecanasa (ADAMTS4, ADAMTS11)                                                                                                                                                                                | agrecanos (proteoglicanos)                                         |
|                                                         |                                                                                                                                                                                                               |                                                                    |
| trombosis                                               | factor Xa (trombocinasa)                                                                                                                                                                                      | Protrombina                                                        |
| trombosis                                               | ADAMTS 13                                                                                                                                                                                                     | factor von Willebrand (vWF)                                        |
| trombosis                                               | activador del plasminógeno, tPA                                                                                                                                                                               | Plasminógeno                                                       |
|                                                         |                                                                                                                                                                                                               |                                                                    |
| Natriuresis renal por presión inducida por el estrés    | Prostasina                                                                                                                                                                                                    | subunidades de canales de Na epiteliales                           |

Tabla 2

| ENFERMEDAD                                                                              | SUSTRATO DIANA                                     | ENZIMA                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Inflamación                                                                             | Interleucina 1 beta                                | MMP-2, MMP-3, MMP-9, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C |
| Disfunción de la glándula pituitaria, densidad ósea anormal, trastornos del crecimiento | IGFBP-3                                            | MMP-1, MMP-3, MMP-9, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C |
| Cáncer                                                                                  | TGF-beta                                           | MMP-9, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Cáncer, enfermedad autoinmunitaria                                                      | TNF                                                | MMP-7, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Cáncer, enfermedad autoinmunitaria                                                      | FASL                                               | MMP-7, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Cicatrización, enfermedad cardíaca                                                      | HB-EGF                                             | MMP-3, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Síndrome de Pfeiffer                                                                    | FGFR1                                              | MMP-2, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Cáncer                                                                                  | Decorina                                           | MMP-2, MMP-3, MMP-7, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C |
| Cáncer                                                                                  | Antígenos de hidratos de carbono asociados a tumor | Endoglucosidasas                                                                  |
| Cáncer                                                                                  | Sialil Lewis <sup>a</sup>                          | O-glucanasa                                                                       |
| Cáncer                                                                                  | Sialil Lewis                                       | O-glucanasa                                                                       |
| Cáncer/ artritis reumatoide, hipertensión pulmonar                                      | VEGF                                               | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer                                                                                  | EGF                                                | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer                                                                                  | IL2                                                | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Inflamación por cáncer/angiogénesis                                                     | IL6                                                | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer                                                                                  | IFN-γ                                              | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Inflamación por cáncer/angiogénesis, artritis reumatoide                                | TNF-α                                              | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer, fibrosis pulmonar, asma                                                         | TGF-β                                              | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer, hipertensión pulmonar                                                           | PDGF                                               | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer, cistoadenoma pulmonar                                                           | Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)        | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer                                                                                  | Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)    | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Cáncer                                                                                  | Factores reguladores de interferón (IRF-1, IRF-2)  | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Inhibidor de supresores tumorales                                                       | MIF                                                | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |
| Linfomas/carcinomas, proteinosis alveolar                                               | GM-CSF                                             | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C                      |

(continuación)

| ENFERMEDAD                                                                                                    | SUSTRATO DIANA                  | ENZIMA                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Invasión por cáncer                                                                                           | M-CSF                           | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Carcinogénesis química, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn                         | IL-12                           | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Leucemias de linfocitos T citolíticos espontáneos, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide | IL-15                           | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Cirrosis                                                                                                      | Inhibidor tisular de MMP (TIMP) | Tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C               |
| Cirrosis                                                                                                      | Colágeno I, III                 | MMP-1, MMP-8, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C |
| Cirrosis                                                                                                      | Colágeno IV, V                  | MMP-2, tripsina, quimotripsina, pepsina, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C        |

Varias de las enzimas/sustratos descritos anteriormente se describen en las siguientes publicaciones, todas las cuales se incorporan en el presente documento en su totalidad como referencia: Parks, W.C. and R.P. Mecham (Eds): Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998; Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr. (1999) J. Biol. Chem. 274:21491; Ito, A. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:14657; Schonbeck, U. et al. (1998) J. Immunol. 161: 3340; Rajah, R. et al. (1999) Am. J. Cell Mol. Biol. 20:199; Fowlkes, J.L. et al. (1994) Endocrinology 135:2810; Manes, S. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:6935; Mira, E. et al. (1999) Endocrinology 140:1657; Yu, Q. and I. Stamenkovic (2000) Genes Dev. 14:163; Haro, H. et al. (2000) J. Clin. Invest. 105:143; Powell, C.P. et al. (1999) Curr. Biol. 9:1441; Suzuki, M. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:31730; Levi, E. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7069; Imai, K. et al. (1997) Biochem. J. 322:809; Smith, M.M. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:6440; y Dranoff, G. (2004) Nat. Rev. Cancer 4: 11-22.

El marcador detectable susceptible a enzimas se puede fijar directamente al vehículo. Por ejemplo, se puede recubrir directamente sobre la superficie de micropartículas usando técnicas conocidas. Alternativamente, si el vehículo es un material de proteína, se puede conectar directamente a través de un enlace peptídico. Además, el marcador detectable susceptible a enzimas se puede conectar al dominio de vehículo a través del uso de un conector. Como se usa en el presente documento, "enlazar" o "enlace" significa que dos entidades se unen entre sí por cualquier medio fisicoquímico. Está englobado cualquier enlace conocido por los expertos habituales en la técnica, covalente o no covalente. Así, en algunas realizaciones, el vehículo tiene un conector unido a una superficie externa, que se puede usar para unir el marcador detectable susceptible a enzimas. También se puede fijar otra molécula al conector.

El marcador detectable susceptible a enzimas es preferentemente un polímero constituido de una pluralidad de unidades químicas. Una "unidad química", como se usa en el presente documento, es un elemento estructural o monómero que se puede unir directa o indirectamente a otros elementos estructurales o monómeros para formar un polímero. En algunas realizaciones, el marcador detectable susceptible a enzimas es un péptido que es susceptible a la escisión por una enzima o provoca la escisión de un sustrato asociado a una enfermedad o afección. Se presentan en la tabla anterior varios de los ejemplos de cuando el sitio de escisión proteolítica es un péptido.

El dominio susceptible a enzimas también puede ser un polisacárido. Algunas enzimas degradadoras específicas de polisacárido están asociadas con tumores, angiogénesis y otras afecciones. Un "polisacárido" es un biopolímero que comprende unidades de sacárido o azúcar unidas. Los polisacáridos usados como dominios susceptibles proteolíticos se pueden aislar o sintetizar *de novo*. Por ejemplo, los polisacáridos se pueden aislar de fuentes naturales, por ejemplo purificar, como por escisión y separación en gel o se pueden sintetizar, por ejemplo, por síntesis química e incorporar en la nanopartícula de biomarcador.

Por ejemplo, las enzimas degradadoras de HSGAG son enzimas que se pueden analizar según los métodos de la invención. Las enzimas degradadoras de HSGAG incluyen heparinasa-I, heparinasa-II, heparinasa-III, D-glucuronidasa y L-iduronidasa. Las heparinasas escinden en el enlace glucosídico antes que un ácido urónico. La heparinasa I corta en un enlace glucosídico antes que un ácido idurónico 2-O sulfatado. La heparinasa-III escinde en un enlace glucosídico antes que un ácido glucurónico no sulfatado. La heparinasa-II escinde en tanto sitios escindibles Hep-I como Hep-III. La glucuronidasa e iduronidasa, como sugiere su nombre, se escinden en el enlace glucosídico después de un ácido glucurónico y ácido idurónico, respectivamente. El ácido nitroso corta aleatoriamente en enlaces glucosídicos después de una hexosamina N-sulfatada y convierte el anillo de hexosamina de seis miembros en un anillo de anhidromanitol de 5 miembros. Se pueden diseñar dominios susceptibles a enzimas apropiados basándose en los sustratos conocidos y sitios de escisión de estas enzimas.

La nanopartícula de biomarcador también puede incluir un microdispositivo de administración implantable que aloja la estructura modular. Un microdispositivo de administración implantable es cualquier tipo de dispositivo, que está dimensionado para implantación en un cuerpo y puede retener la estructura modular. Por ejemplo, el dispositivo puede ser una cápsula implantable que contiene la estructura modular alojada en su interior. La cápsula puede tener una membrana semipermeable, de forma que la estructura modular no pueda pasar a través de la membrana, pero que sea permeable a las moléculas endógenas tales como enzimas y sustratos, así como a marcadores detectables. Alternativamente, el microdispositivo de administración implantable puede ser un chip que tiene la estructura modular adherida a él. Los ejemplos de microdispositivos de administración implantables incluyen, pero no se limitan a, cápsulas implantables, chips, formulaciones de liberación sostenida, dispositivo de microchip polimérico resorbible de administración de fármaco multipulsada (Grayson et al. Nature Materials, VOL 2, Nov 2003, p. 767) y microchips de liberación controlada (Santini et al. Nature, vol 397, 1999, p. 335). Estos dispositivos se pueden fabricar de muchos materiales que incluyen muchos de los materiales poliméricos descritos en el presente documento. Preferentemente, los dispositivos implantables son biocompatibles y no tóxicos.

La modificación del dominio susceptible a enzimas por una enzima *in vivo* da como resultado la producción de un marcador detectable. Alternativamente, cuando el marcador detectable susceptible a enzimas es una enzima, la enzima escinde un sustrato endógeno que produce un marcador detectable del sustrato endógeno. El marcador detectable es una molécula detectable. Puede ser parte del dominio susceptible a enzimas, por ejemplo, el trozo que se suelta o se añade después de la escisión, o puede ser una entidad separada. Preferiblemente, el marcador detectable está compuesto por dos ligandos unidos por un conector, como se ha descrito anteriormente. El marcador detectable puede estar comprendido de, por ejemplo, uno o más de un péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, fluoróforo/extintor, hidrato de carbono, partícula, radiomarca, compuesto activo para IRM, material inorgánico, material orgánico, con características codificadas para facilitar la óptima detección.

El marcador detectable se puede detectar por cualquier método de detección conocido para lograr la etapa de captura/detección. Se pueden usar varios métodos, dependiendo de la naturaleza del marcador detectable. Los marcadores detectables se pueden detectar directamente, después de la captura, mediante densidad óptica, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiactiva, o los marcadores detectables se pueden detectar indirectamente con conjugados de anticuerpo, columnas de afinidad, conjugados de estreptavidina-biotina, análisis por PCR, micromatriz de ADN y análisis de fluorescencia.

El ensayo de captura en algunas realizaciones implica una etapa de detección seleccionada del grupo que consiste en un ELISA, que incluye ELISA fluorescentes, colorimétricos, bioluminiscentes y quimioluminiscentes, una tira reactiva de papel o EFL, ensayo fluorescente basado en células y detección sin marcas, tal como resonancia de plasmones superficiales (RPS). El ensayo de captura puede implicar, por ejemplo, la unión del ligando de captura a un agente de afinidad.

La etapa de análisis se puede realizar directamente sobre la muestra biológica o el componente distintivo se puede purificar hasta cierto grado primero. Por ejemplo, una etapa de purificación puede implicar aislar el marcador detectable de otros componentes en la muestra biológica. Las etapas de purificación incluyen métodos tales como cromatografía de afinidad. Como se usa en el presente documento, una "molécula aislada" o "molécula purificada" es un marcador detectable que se aísla de algún modo de su entorno natural. La molécula aislada o purificada no necesita ser 100 % pura o incluso sustancialmente pura antes del análisis.

Se pueden usar métodos para analizar los marcadores detectables identificando la presencia de un marcador detectable para proporcionar una evaluación cualitativa de la molécula (por ejemplo, si el marcador detectable está presente o ausente) o una evaluación cuantitativa (por ejemplo, la cantidad de marcador detectable presente para indicar un nivel de actividad comparativo de las enzimas). El valor cuantitativo se puede calcular mediante cualquier medio, tal como determinando el porcentaje de cantidad relativa de cada fracción presente en la muestra. Se conocen en la técnica los métodos para hacer estos tipos de cálculos.

Cuando el marcador detectable es un ácido nucleico, también se puede analizar usando PCR y micromatrices. Los métodos de PCR se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 5.333.675, concedida a Mullis et al., describe un aparato y método para realizar PCR automatizada. En general, el rendimiento de un método de PCR da como resultado la amplificación de una región de ADN seleccionada proporcionando dos cebadores de ADN, cada uno de los cuales es complementario a una porción de una cadena dentro de la región de ADN seleccionada. El cebador se hibrida con una cadena de molde de ácido nucleico en presencia de trifosfatos de desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y una enzima extensora de la cadena, tal como ADN polimerasa. Los cebadores se hibridan con las cadenas separadas, formando moléculas de ADN que son monocatenarias, excepto por la región hibridada con el cebador, donde son bicatenarias. Las regiones bicatenarias se extienden por la acción de la enzima extensora de la cadena (por ejemplo, ADN polimerasa) para formar una molécula bicatenaria extendida entre los dos cebadores originales. Las moléculas de ADN bicatenario se separan para producir cadenas individuales que entonces se pueden volver a hibridar con los cebadores. El proceso se repite durante varios ciclos para generar una serie de cadenas de ADN que tienen la misma secuencia de nucleótidos entre y que incluye los cebadores.

Las enzimas extensoras de la cadena se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T7 modificada recombinante, transcriptasa inversa y otras enzimas. Se prefieren particularmente las enzimas estables al calor, ya que son útiles en el equipo de ciclo térmico automatizado. Las polimerasas estables al calor incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas aisladas de *Bacillus stearothermophilus* (Bio-Rad), *Thermus thermophilus* (finzyme, número ATCC 27634), especies de *Thermus* (número ATCC 31674), cepa TV11518 de *Thermus aquaticus* (número ATCC 25105), *Sulfolobus acidocaldarius*, descrito por Bukhrashuili et al., Biochem. Biophys. Acta., 1008:102-07 (1909), *Thermus filiformis* (número ATCC 43280), ADN polimerasa Taq, comercialmente disponible de Perkin-Elmer-Cetus (Norwalk, Connecticut), Promega (Madison, Wis.) y Stratagene (La Jolla, Calif.) y ADN polimerasa AmpliTaq™, una ADN polimerasa Taq de *Thermus equitatus* recombinante, disponible de Perkin-Elmer-Cetus y descrita en la patente de EE. UU. N° 4.889.818.

Preferentemente, los métodos basados en PCR realizados según la invención son automáticos y se realizan usando cicladores térmicos. Se conocen bien en la técnica muchos tipos de cicladores térmicos. Por ejemplo, M.J. Research (Watertown, MA) proporciona un ciclador térmico que tiene una bomba de calor de peltier para proporcionar un control preciso de la temperatura uniforme en los cicladores térmicos; los cicladores térmicos DeltaCycler de Ericomp (San Diego, CA) también se basan en peltier e incluyen control de rampa automático, programación de la extensión tiempo/temperatura y una elección de configuraciones de tubo o de microplaca. El RoboCycler™ por Stratagene (La Jolla, CA) incorpora robótica para producir rápidas transiciones de temperatura durante el ciclado y la uniformidad de pocillo a pocillo entre las muestras; y un ciclador particularmente preferido es el ciclador térmico integrado Perkin-Elmer Applied Biosystems (Foster City, CA) ABI Prism™ 877, que funciona mediante una interfaz programable que automatiza la manipulación de líquidos y los procesos de termociclado para la secuenciación de ADN fluorescente y reacciones de PCR.

La presencia o ausencia de enzimas en el sujeto también se puede determinar usando técnicas de hibridación. Las técnicas de hibridación convencionales de tecnología de micromatrices se utilizan para evaluar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra biológica. La tecnología de micromatrices, que también se conoce por otros nombres que incluyen: tecnología de chip de ADN, tecnología de chip génico y tecnología de matrices de ácido nucleico en fase sólida, se conoce bien por los expertos habituales en la técnica y se basa en, pero no se limita a, obtener una matriz de sondas de ácido nucleico identificadas sobre un sustrato fijo, marcar las moléculas diana con moléculas indicadoras (por ejemplo, marcas radiactivas, quimioluminiscentes o fluorescentes tales como fluoresceína, Cy3-dUTP o Cy5-dUTP), hibridar ácidos nucleicos diana con las sondas y evaluar la hibridación diana-sonda. Una sonda con una secuencia de ácidos nucleicos que se corresponde perfectamente con la secuencia diana dará, en general, como resultado la detección de una señal de molécula indicadora más fuerte que las sondas con menos apareamientos perfectos. Muchos componentes y técnicas utilizados en la tecnología de matrices de ácidos nucleicos se presentan en The Chipping Forecast, Nature Genetics, Vol, 21, enero de 1999, cuyo contenido completo se incorpora como referencia en el presente documento.

Según la presente invención, los sustratos de micromatrices pueden incluir, pero no se limitan a, vidrio, sílice, aluminosilicatos, borosilicatos, óxidos metálicos tales como alúmina y óxido de níquel, diversas arcillas, nitrocelulosa o nailon. En todas las realizaciones se prefiere un sustrato de vidrio. Una "matriz", como se usa en el presente documento, es un conjunto de moléculas dispuestas en un orden específico con respecto a una superficie. Preferentemente, la matriz está compuesta por polinucleótidos unidos a la superficie. Se pueden usar matrices de oligonucleótidos para cribar las muestras de ácido nucleico para un ácido nucleico diana, que se puede marcar con un marcador detectable. Una señal fluorescente resultante de la hibridación entre un ácido nucleico diana y un oligonucleótido unido a sustrato proporciona información referente a la identidad del ácido nucleico diana como referencia a la localización del oligonucleótido en la matriz sobre el sustrato. Dicho ensayo de hibridación puede generar miles de señales que presentan diferentes intensidades de señal. Estas señales corresponden a oligonucleótidos particulares de la matriz. Las diferentes intensidades de señal surgirán basándose en la cantidad de ácido nucleico diana marcado hibridado con un oligonucleótido de la matriz.

Se conocen condiciones para la hibridación óptima. Las condiciones de hibridación son en general las comúnmente usadas en la técnica, tales como las descritas en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (1989), 2ª ed., Cold Spring Harbor, NY; Berger y Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques", Methods in Enzymology, (1987), Volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA; y Young y Davis, (1983), PNAS (USA) 80:1194. En general, las temperaturas de incubación para la hibridación de ácidos nucleicos varían desde aproximadamente 20 °C hasta 75 °C. Para sondas de 17 restos de nucleótidos y más largas, un intervalo de temperatura preferido para la hibridación es desde aproximadamente 50 °C hasta 54 °C. La temperatura de hibridación para sondas más largas es preferentemente desde aproximadamente 55 °C hasta 65 °C y para sondas más cortas es inferior a 52 °C. La rehibridación se puede realizar en varios marcos de tiempo. Preferentemente, la hibridación de SNP y RCG se realizó durante al menos 30 minutos.

El marcador detectable se puede marcar. Por ejemplo, se puede añadir directamente una marca a un ácido nucleico cuando el marcador detectable aislado se somete a PCR. Por ejemplo, una reacción de PCR realizada usando cebadores marcados o nucleótidos marcados producirá un producto marcado. Están comercialmente disponibles nucleótidos marcados (por ejemplo, CTP marcada con fluoresceína). Los expertos habituales en la técnica conocen

bien los métodos de unión de marcas a ácidos nucleicos y, además del método de PCR, incluyen, por ejemplo, traducción de mellas y marcado de extremos.

Las marcas adecuadas para su uso en los métodos incluyen cualquier tipo de marca detectable por medios habituales, que incluyen métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los tipos preferidos de marcas incluyen marcas fluorescentes tales como fluoresceína. Una marca fluorescente es un compuesto que comprende al menos un fluoróforo. Las marcas fluorescentes comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, fluoresceína fosforamidas tales como fluoreprime (Farmacia, Piscataway, NJ), fluoreidita (Millipore, Bedford, MA), FAM (ABI, Foster City, CA), rodamina, derivado de colorante de polimetadina, fósforos, rojo Texas, proteína verde fluorescente, CY3 y CY5. Los polinucleótidos se pueden marcar con una o más marcas fluorescentes espectralmente distintas. Las marcas fluorescentes "espectralmente distintas" son marcas que se pueden distinguir entre sí basándose en uno o más de sus espectros de absorción característicos, espectros de emisión, vidas fluorescentes, o similares. Las marcas fluorescentes espectralmente distintas tienen la ventaja de que se pueden usar en combinación ("multiplexación"). También son marcas útiles según los métodos de la invención los radionúclidos tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^{32}\text{P}$ . Se pueden usar una pluralidad de radionúclidos radiactivamente distinguibles. Dichos radionúclidos se pueden distinguir, por ejemplo, basándose en el tipo de radiación (por ejemplo, radiación  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ ) emitida por los radionúclidos. La señal de  $^{32}\text{P}$  se puede detectar usando un Phosphorimager, que actualmente tiene una resolución de aproximadamente 50 micrómetros. También se pueden usar otras técnicas conocidas, tales como quimioluminiscencia o colorimétricas (reacción enzimática de color).

También se puede usar composiciones extintoras en las que un fluoróforo "donante" se une a un cromóforo "aceptor" por un puente corto que es el sitio de unión para la enzima. La señal del fluoróforo donante se inactiva por el cromóforo aceptor a través de un proceso que se cree que implica la transferencia de energía resonante (TER). La escisión del péptido da como resultado la separación del cromóforo y fluoróforo, retirada del extintor y generación de una señal posterior medida a partir del fluoróforo donante.

Una vez se obtienen los datos, por ejemplo como una imagen bidimensional, se puede usar un ordenador para transformar los datos en una imagen presentada que varía en color dependiendo de la intensidad de emisión de luz en una localización particular. Se puede usar cualquier tipo de software comercial que pueda realizar este tipo de análisis de datos. En general, el análisis de datos implica las etapas de determinar la intensidad de la fluorescencia emitida en función de la posición sobre el sustrato, retirar los valores atípicos y calcular la afinidad de unión relativa. Se usa uno o más de la presencia, ausencia e intensidad de señal correspondiente a una marca para evaluar la presencia o ausencia de un marcador detectable. Se puede usar la presencia y ausencia de uno o más marcadores detectables para determinar el estado de enfermedad de un individuo basándose en la presencia o ausencia de una enzima.

Los datos también se pueden observar y analizar manualmente. Por ejemplo, se puede observar la presencia o ausencia de una marca fluorescente para proporcionar la información de diagnóstico o pronóstico a partir de los datos.

La enfermedad o afección evaluada según los métodos de la invención es cualquier enfermedad o afección que esté asociada con una enzima. Por ejemplo, se conoce que cáncer, enfermedad cardiovascular, artritis, infección viral, bacteriana, parasítica o fúngica, enfisema por enfermedad de Alzheimer, trombosis, hemofilia, accidente cerebrovascular, disfunción orgánica, cualquier afección inflamatoria, enfermedad vascular, enfermedad parenquimal, o un estado farmacológicamente inducido, se asocian todos con las enzimas. Un estado farmacológicamente inducido es una afección en la que inhibidores enzimáticos y otros agentes afectan directa o indirectamente las actividades enzimáticas. Así, se puede evaluar o monitorizar o estudiar cada uno de estos según los métodos de la invención.

Es útil ser capaz de diferenciar tumores primarios no metastásicos de tumores metastásicos, debido a que la metástasis es una causa importante de fallo del tratamiento en pacientes con cáncer. Si la metástasis se puede detectar pronto, se puede tratar agresivamente para detener la progresión de la enfermedad. La metástasis es un proceso complejo que implica el desprendimiento de células de un tumor primario, movimiento de las células a través de la circulación y colonización eventual de las células tumorales en sitios de tejido locales o distantes. Además, es conveniente ser capaces de detectar una predisposición para el desarrollo de un cáncer particular de forma que se monitorice y se pueda iniciar el tratamiento temprano. Por ejemplo, se ha descrito un amplio análisis citogenético de tumores malignos hematológicos, tales como linfomas y leucemias, véase, por ejemplo, Solomon et al., Science 254, 1153-1160, 1991. Puede ser útil la detección precoz o la monitorización usando los métodos no invasivos de la invención.

Los tumores sólidos progresan desde la tumorigénesis a través de una etapa metastásica y a una etapa en la que pueden estar implicadas varias proteasas activas diferentes. Se cree que alguna proteasa altera el tumor de forma que pueda progresar a la siguiente etapa, es decir, confiriendo ventajas proliferativas, la capacidad para desarrollar la resistencia a un fármaco o capacidad mejorada de angiogénesis, proteólisis o metastásica.

La enfermedad de Alzheimer provoca demencia progresiva con la consecuente formación de placas de amiloide, ovillos neurofibrilares, gliosis y pérdida neuronal. La enfermedad ocurre en tanto formas genéticas como esporádicas cuya evolución clínica y características patológicas son bastante similares. Se han descubierto tres genes hasta la

fecha que, cuando mutan, provocan una forma dominante autosómica de la enfermedad de Alzheimer. Estos codifican la proteína precursora de amiloide (APP) y dos proteínas relacionadas, presenilina-1 (PS1) y presenilina-2 (PS2). Se han observado mutaciones en cualquiera de las tres proteínas para potenciar el procesamiento proteolítico de APP por una vía intracelular que produce péptido amiloide-beta (péptido A), un péptido de 40-42 aminoácidos de longitud que es el componente primario de la placa de amiloide en enfermedad de Alzheimer. El procesamiento patológico de APP en los sitios de - y y-secretasa, que se localizan en el extremo N y extremo C con respecto al sitio de a-secretasa, respectivamente, produce un resultado muy diferente del procesamiento en el sitio a. El procesamiento secuencial en los sitios de - y y-secretasa libera el péptido A $\beta$ , un péptido posiblemente muy importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Se cree que la enzima  $\beta$ -secretasa, denominada aspartil proteasa 2 (Asp2), media en este procesamiento. La presencia de actividad de Asp2 es importante para el diagnóstico y el pronóstico de enfermedad de Alzheimer. También se puede usar esta enzima y su sustrato en los métodos de monitorización de la capacidad de un terapéutico para funcionar en el ralentizamiento de la progresión de enfermedad de Alzheimer.

Los métodos también pueden ser útiles para detectar la presencia de coágulos en un sujeto analizando la actividad de trombina. Mientras que IRM o ultrasonidos pueden resolver con exactitud la carga relativa y la localización anatómica de coágulos, actualmente no pueden discriminar coágulos biológicamente activos de los estables. Por ejemplo, se recetan anticoagulantes a los pacientes que presentan DVT si existe evidencia de que sus coágulos se están extendiendo - un diagnóstico que requiere la monitorización continua de su carga de coágulos durante el transcurso de semanas - que se podría predecir posiblemente por la elevada actividad de la trombina en una fase más temprana cuando los trombos son más sensibles a terapias fibrinolíticas. [27] Los estudios relacionados en la obtención de imágenes de placas ateroscleróticas mostraron que la medición de la actividad de la trombina puede ser suficientemente predictiva para estadificar y diferenciar placas intensas de estables que podrían no ser discriminadas basándose en características anatómicas solo. [9c]

Como se usa en el presente documento, un sujeto es un humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, ovejas, cabra, perro, gato o roedor. En todas las realizaciones, se prefieren los sujetos humanos. En aspectos de la invención que se refieren al diagnóstico del cáncer en general, el sujeto es preferentemente un humano que se sospecha que tiene cáncer, o un humano que ha sido previamente diagnosticado con cáncer. Los métodos para identificar sujetos que se sospecha que tienen cáncer pueden incluir exploración física, antecedentes médicos de la familia del sujeto, antecedentes médicos del sujeto, biopsia, o varias tecnologías de obtención de imágenes tales como ultrasonografía, tomografía computerizada, imagen por resonancia magnética, espectroscopia por resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones.

Como se usa en el presente documento, una muestra biológica es una muestra de tejido. La muestra biológica se puede examinar en el cuerpo, por ejemplo, detectando una marca en el sitio del tejido, es decir, orina. Alternativamente, la muestra biológica se puede recoger del sujeto y examinar *in vitro*. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, orina, sangre, saliva o secreción mucosa. En realizaciones preferidas, la muestra de tejido se obtiene no invasivamente, tal como la orina.

Una "pluralidad" de elementos, como se usa en toda la solicitud, se refiere a 2 o más de los elementos.

Las nanopartículas de biomarcador se administran al sujeto en una cantidad eficaz para detectar la actividad enzimática. Una "cantidad eficaz" es, por ejemplo, una cantidad necesaria o suficiente para provocar la liberación de un nivel detectable de marcador detectable en presencia de una enzima. La cantidad eficaz de un compuesto de la invención descrito en el presente documento puede variar dependiendo del compuesto específico usado, el modo de administración del compuesto, y si se usa solo o en combinación. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular también puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad que se evalúa o se trata, el compuesto particular que se administra, el tamaño del sujeto, o la intensidad de la enfermedad o afección, así como el método de detección. Un experto habitual en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una molécula particular de la invención sin necesidad de excesiva experimentación. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, eligiendo entre los diversos compuestos activos y ponderando factores tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la intensidad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planificar una pauta posológica eficaz.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más agentes, disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéutico o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un humano, según convenga. Además, para la administración a animales (por ejemplo, humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir la esterilidad, la pirogenicidad, la seguridad general y los patrones de pureza según se requiera por la Oficina de Patrones Biológicos de la FDA.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes que retrasan la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármaco, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes,

edulcorantes, aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como conocería un experto habitual en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)). Excepto en la medida de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas. El agente puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o de aerosol, y si necesita que sea estéril para dichas vías de administración como inyección.

Preferentemente, el material se inyecta en el cuerpo, pero también se podría administrar por otras vías. Por ejemplo, los compuestos se pueden administrar por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intrarterial, por vía intralesional, por vía intratumoral, por vía intracraneal, por vía intrarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleural, por vía intratraqueal, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía tópica, por vía intratumoral, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía subconjuntiva, por vía intravesicular, por vía mucosa, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía intraocular, por vía oral, por vía tópica, por vía local, inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada, por baño de células diana directamente, por un catéter, por un lavado, en cremas, en composiciones de lípidos (por ejemplo, liposomas), o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como se conocería por un experto habitual en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)).

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 % de un compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable intermedio.

El agente se puede formular en una composición en una forma de base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones donde la composición está en una forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero no se limitan a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido por la dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; usando tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos de dichos métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o combinaciones de los mismos.

Según los métodos de la invención, el compuesto se puede administrar en una composición farmacéutica. En general, una composición farmacéutica comprende el compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para péptidos, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Como se usa en el presente documento, un vehículo farmacéuticamente aceptable significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes y otros materiales que se conocen bien en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo para péptidos en particular se describen en la patente de EE. UU. N° 5.211.657. Dichas preparaciones pueden contener rutinariamente sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no se excluyen del alcance de la invención. Dichas sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Por tanto, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Los compuestos se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inhalantes e inyecciones, y formas usuales para administración oral, parenteral o quirúrgica. También se describen composiciones farmacéuticas que se formulan para administración local, tal como por implantes.

Las composiciones adecuadas para administración por vía oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, cada una conteniendo una cantidad predeterminada del agente

activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

Los compuestos se pueden administrar directamente a un tejido. La administración directa al tejido se puede lograr por inyección directa. Los compuestos se pueden administrar una vez, o alternativamente se pueden administrar en una pluralidad de administraciones. Si se administran múltiples veces, los compuestos se pueden administrar por vías diferentes. Por ejemplo, las primeras (o algunas de las primeras) administraciones se pueden hacer directamente en el tejido afectado, mientras que las administraciones posteriores pueden ser sistémicas.

Para administración por vía oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular los compuestos de la invención como comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto que se va a tratar. Se pueden obtener preparaciones farmacéuticas para uso oral como excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Opcionalmente, también se pueden formular formulaciones orales en solución salina o tampones para neutralizar condiciones ácidas internas, o se pueden administrar sin vehículos.

Se proporcionan núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar disoluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir tintas o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. También se puede usar microesferas formuladas para administración por vía oral. Dichas microesferas se han definido bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración por vía oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

Para administración por vía oral, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso según la presente invención pueden ser convenientemente administrados en forma de una presentación de espray en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para preparar sistemas de administración de aerosol. En general, dichos sistemas deben utilizar componentes que no alterarán significativamente las propiedades biológicas del agente activo (véase, por ejemplo, Sciarra and Cutie, "Aerosols", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, pp 1694-1712). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para producir aerosoles recurrir a excesiva experimentación.

Los compuestos, cuando se desea para administrarlos por vía sistémica, se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tales como agentes e suspensión, estabilizadores y/o dispersantes.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados.

Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares. Resultarán dosis más bajas de otras formas de administración, tales como administración intravenosa. En el supuesto caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales administradas, se pueden emplear dosis más altas (o dosis eficazmente más altas por una vía de administración diferente, más localizada) hasta el punto que lo permita la tolerancia del paciente. Se contemplan dosis múltiples por día para lograr niveles sistémicos apropiados de compuestos.

Los datos generados según la invención se pueden convertir opcionalmente en un código de barras u otra forma legible por un humano o máquina. Por ejemplo, cada línea de un código de barras puede indicar la presencia o ausencia de una enzima específica o grupos de enzimas específicas para un sujeto particular. Los datos del código de barras se pueden comparar con una base de datos de información sobre otros sujetos o información sobre la enfermedad para ayudar en el diagnóstico, pronóstico u otro análisis del sujeto de prueba.

En una realización de la invención, los datos generados en el presente documento se usan para seleccionar paradigmas de tratamiento clínico para cánceres. Las opciones de tratamiento, como se describe en el presente documento, pueden incluir, pero no se limitan a: radioterapia, quimioterapia, terapia adyuvante, o cualquier combinación de los métodos anteriormente mencionados. Los aspectos de tratamiento que puede variar incluyen, pero no se limitan a: dosis, momento exacto de la administración, o duración o terapia; y pueden o pueden no combinarse con otros tratamientos, que también pueden variar en dosis, momento exacto o duración. Otro tratamiento para el cáncer es la cirugía, que se puede utilizar tanto sola como en combinación con cualquiera de los métodos de tratamiento anteriormente mencionados. Un experto en las artes médicas puede determinar un paradigma de tratamiento apropiado basado en la evaluación de los datos generados por los métodos descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, se puede proporcionar software para calcular y procesar los datos que se describen en el presente documento en un ordenador conectado por conexión de datos a un dispositivo generador de datos, tal como un espectrómetro de masas, lector de micromatrices o máquina de PCR. Se puede usar cualquier conexión de datos habitual, que incluye cables en serie o en paralelo, conexiones de telemetría por radiofrecuencia o infrarrojos, conexiones LAN, conexiones WAN, etc. Alternativamente, se pueden transferir datos por medio legible por ordenador (por ejemplo, medio magnético u óptico) y leído por el software. Los datos también pueden ser directamente entrados por el usuario por la interfaz de usuario, tal como un teclado, monitor, ratón, interfaz de usuario gráfica tal como pantalla táctil, etc. El ordenador puede estar contenido dentro del dispositivo de generación de datos, que proporciona un sistema integrado para generar datos sin procesar, que calcula relaciones y que presenta dichas relaciones. También se pueden unir uno o más ordenadores a uno o más dispositivos de generación de datos y uno o más dispositivos de presentación, tales como en una red de área local o red de área amplia.

En una realización, se usa una presentación visual para presentar los datos para la clasificación, diagnóstico, predicción de pronóstico y/o monitorización terapéutica. La presentación visual puede ser una interfaz de usuario gráfica, tal como un monitor, o una impresora.

Los datos se pueden procesar individualmente o por un ordenador. Por ejemplo, se puede realizar según la invención un método implementado por ordenador para generar una estructura de datos, tangiblemente integrada en un medio legible por ordenador, que representa un valor cuantitativo de un conjunto de marcadores detectables. Se pueden comparar valores cuantitativos con una base de datos de referencia. Alternativamente, se puede comparar un patrón cualitativo con una base de datos de referencia.

Un sistema informático que puede implementar lo anterior como un programa informático puede incluir normalmente una unidad principal conectada a tanto un dispositivo de salida que muestra la información como a un usuario y un dispositivo de entrada que recibe una entrada de un usuario. La unidad principal incluye, en general, un procesador conectado a un sistema de memoria por un mecanismo de interconexión. También se pueden conectar el dispositivo de entrada y el dispositivo de salida al procesador y el sistema de memoria por el mecanismo de interconexión.

Se pueden conectar uno o más dispositivos de salida al sistema informático. Los dispositivos de salida de ejemplo incluyen una presentación de tubo de rayo catódico (CRT), pantalla de cristal líquido (LCD), impresoras, dispositivos de comunicación tales como un módem, y salida de audio. También se pueden conectar uno o más dispositivos de salida al sistema informático. Los dispositivos de entrada de ejemplo incluyen un teclado, teclado numérico, bola de seguimiento, ratón, bolígrafo o tableta, dispositivo de comunicación y dispositivos de entrada de datos tales como sensores. La materia en el presente documento se desvela no limitada a los dispositivos de entrada o salida particulares usados en combinación con el sistema informático o a los descritos en el presente documento.

El sistema informático puede ser un sistema informático de uso general que es programable usando un lenguaje de programación informática, tal como C++, Java u otro lenguaje, tal como un lenguaje de encriptado o lenguaje de ensamblaje. El sistema informático también puede incluir hardware especialmente programado, de fin especial, tal

como, por ejemplo, un circuito integrado de aplicación específica (ASIC). En un sistema informático de uso general, el procesador es normalmente un procesador comercialmente disponible, de los cuales son ejemplos los procesadores de la serie x86, Celeron y Pentium, disponible de Intel, y dispositivos similares de AMD y Cyrix, los procesadores de la serie 680X0 disponibles de Motorola, el microprocesador PowerPC de IBM y los procesadores de la serie Alfa de Digital Equipment Corporation. Están disponibles muchos otros procesadores. Dicho microprocesador ejecuta un programa denominado un sistema operativo, de los que son ejemplos Windows NT, Linux, UNIX, DOS, VMS y OS8, que controla la ejecución de otros programas informáticos y proporciona planificación, depuración, control de entrada/salida, contabilización, compilación, asignación del almacenamiento, gestión de datos y gestión de la memoria, y control de la comunicación y servicios relacionados. El procesador y el sistema operativo definen una plataforma de ordenador para la que se pueden escribir programas de aplicación en lenguajes de programación de alto nivel.

Un sistema de memoria incluye normalmente un medio de registro no volátil legible y escribible por ordenador, del que son ejemplos un disco magnético, una memoria flash y cinta. El disco puede ser extraíble, tal como un "disquete", o permanente, conocido como un disco duro. Un disco tiene varias pistas en las que las señales se almacenan, normalmente en forma binaria, es decir, una forma interpretada como una secuencia de unos y ceros. Dichas señales pueden definir un programa de aplicación para ser ejecutado por el microprocesador, o información guardada en el disco a procesar por el programa de aplicación. Normalmente, en operación, el procesador provoca que se lean los datos del medio de registro no volátil en un elemento de memoria de circuito integrado, que normalmente es una memoria volátil de acceso aleatorio, tal como una memoria dinámica de acceso aleatorio (DRAM) o memoria estática (SRAM). El elemento de memoria de circuito integrado normalmente permite un acceso más rápido a la información por el procesador que el disco. El procesador manipula, en general, los datos dentro de la memoria de circuito integrado y luego copia los datos al disco después de que se complete el procesamiento. Se conocen varios mecanismos para gestionar el movimiento de datos entre el disco y el elemento de memoria de circuito integrado, y la materia en el presente documento se desvela no limitada a dichos mecanismos. Además, la materia en el presente documento se desvela no limitada a un sistema de memoria particular.

La materia desvelada en el presente documento no se limita a una plataforma informática particular, procesador particular o lenguaje de programación de alto nivel particular. Además, el sistema informático puede ser un sistema informático de multiprocesador o puede incluir múltiples ordenadores conectados mediante una red informática. Se debe entender que cada módulo pueden ser módulos separados de un programa informático, o pueden ser programas informáticos separados. Dichos módulos pueden ser operables en ordenadores separados. Se pueden almacenar datos en un sistema de memoria o transmitirse entre sistemas informáticos. La materia desvelada en el presente documento no se limita a ninguna implementación particular usando software o hardware o firmware, o cualquier combinación de los mismos. Los diversos elementos del sistema, ya sea individualmente o en combinación, se pueden implementar como un producto de programa informático tangiblemente incorporado en un dispositivo de almacenamiento legible por máquina para la ejecución por un procesador informático. Se pueden realizar diversas etapas del proceso por un procesador informático que ejecuta un programa tangiblemente incorporado en un medio legible por ordenador para realizar funciones operando en la entrada y generando la salida. Los lenguajes de programación informática adecuados para implementar dicho sistema incluyen lenguajes de programación procedurales, lenguajes de programación orientados por objetos y combinaciones de los dos.

Se describen métodos eficientes adicionales de identificación de agentes farmacológicos o compuestos de partida para agentes activos *in vivo*. En general, los métodos de cribado implican ensayar los compuestos que alteran beneficiosamente la actividad enzimática *in vivo*. Dichos métodos son adaptables a los cribados automáticos de alto rendimiento de compuestos.

Los métodos se pueden usar en cualquier sujeto. Por ejemplo, se pueden usar modelos animales de enfermedad para cribar supuestos múltiples agentes terapéuticos para evaluar el nivel de actividad de los supuestos agentes terapéuticos sobre enzimas particulares asociadas a enfermedad. Por ejemplo, se puede administrar al modelo animal una biblioteca de nanopartículas de biomarcador que tiene diferentes supuestos agentes terapéuticos asociados al vehículo. Si cada agente terapéutico está asociado con un marcador detectable único, entonces la actividad del supuesto agente terapéutico se podría evaluar analizando el nivel de marcador detectable en la orina como se describe en el presente documento.

Además, los métodos se pueden usar para el avance de la medicina personalizada. Por ejemplo, un conjunto de nanopartículas de biomarcador que tienen múltiples agentes terapéuticos, cada agente terapéutico asociado a un marcador detectable discreto se podría administrar a un sujeto que tiene una enfermedad para evaluar qué agente terapéutico es el más eficaz en ese sujeto individual. Basándose en los datos, se podría diseñar una estrategia terapéutica apropiada. Un ejemplo de esto se puede observar en el VIH. Los inhibidores de la proteasa se usan terapéuticamente para inhibir la actividad de proteasas críticas asociadas a la supervivencia y la actividad del VIH. Se podría generar un conjunto de nanopartículas de biomarcador que tiene diferentes inhibidores enzimáticos como vehículo o parte del vehículo. Cada inhibidor enzimático se asocia con un marcador detectable particular, de forma que la actividad del inhibidor particular en la enzima se pueda evaluar monitorizando el nivel de distintivo en la orina. Por ejemplo, un inhibidor particularmente activo provocaría un nivel de marcador detectable reducido que se transporta a la orina.

Normalmente, un agente terapéutico activo conocido puede servir de control negativo, es decir, el agente terapéutico conocido se incorpora en una nanopartícula de biomarcador. Los supuestos agentes terapéuticos, también denominados en el presente documento agentes candidatos, engloban numerosas clases químicas, aunque normalmente son compuestos orgánicos. Preferentemente, los agentes farmacológicos candidatos son compuestos orgánicos pequeños, es decir, los que tiene un peso molecular superior a 50 pero inferior a aproximadamente 2500, preferentemente inferior a aproximadamente 1000 y, más preferentemente, inferior a aproximadamente 500. Los agentes candidatos comprenden grupos químicos funcionales necesarios para interacciones estructurales con polipéptidos y/o ácidos nucleicos, y normalmente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales y más preferentemente al menos tres de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden comprender estructura de carbono cíclico o heterocíclico y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriormente identificados. Los agentes candidatos también pueden ser biomoléculas tales como péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, isoprenoides, purinas, pirimidinas, derivados o análogos estructurales de las anteriores, o combinaciones de los mismos, y similares. Donde el agente es un ácido nucleico, el agente normalmente es una molécula de ADN o de ARN, aunque también se contemplan ácidos nucleicos modificados como se define en el presente documento.

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos aleatorizados, bibliotecas combinatorias orgánicas sintéticas, bibliotecas de presentación en fagos de péptidos aleatorios y similares. Alternativamente, están disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, se pueden modificar fácilmente bibliotecas y compuestos naturales y sintéticamente producidos a través de productos químicos convencionales, medios físicos y bioquímicos. Además, se pueden someter agentes farmacológicos conocidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales de los agentes.

También se describen kits que tienen un recipiente que aloja una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas. El kit también puede incluir un segundo recipiente que aloja un reactivo analítico.

Los kits, también denominados artículos, incluyen compuestos de calidad farmacéutica o de diagnóstico, de la invención en uno o más recipientes. El artículo puede incluir instrucciones o etiquetas que promocionan o que describen el uso de los compuestos de la invención. Por ejemplo, el kit puede incluir instrucciones para administrar la nanopartícula de biomarcador a un sujeto y para analizar el marcador detectable de la nanopartícula de biomarcador en una muestra biológica del sujeto.

Como se usa en el presente documento, "promocionado" incluye todos los métodos de hacer negocio que incluyen métodos de instrucción en educación, hospital y otra instrucción clínica, actividad de la industria farmacéutica que incluye ventas farmacéuticas y cualquier actividad promocional de publicidad u otra publicitaria que incluye comunicación escrita, oral y electrónica de cualquier forma, asociada a composiciones de la invención.

"Instrucciones" puede definir un componente de promoción, y normalmente implica instrucciones escritas en o asociadas a un envase de composiciones de la invención. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada en cualquier modo.

Así, los agentes descritos en el presente documento se pueden ensamblar, en algunas realizaciones, en kits farmacéuticos o de diagnóstico o de investigación para facilitar su uso en las aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación. Un kit puede incluir uno o más receptores que alojan los componentes de la invención e instrucciones para su uso. Específicamente, dichos kits pueden incluir uno o más agentes descritos en el presente documento, junto con instrucciones que describen la aplicación terapéutica prevista y la apropiada administración de estos agentes. En ciertas realizaciones, los agentes en un kit pueden estar en una formulación farmacéutica y dosis adecuada para una aplicación particular y para un método de administración de los agentes.

Se puede diseñar el kit para facilitar el uso de los métodos descritos en el presente documento por los médicos y puede adoptar muchas formas. Cada una de las composiciones del kit, si procede, se puede proporcionar en forma líquida (por ejemplo, en disolución), o en forma sólida, (por ejemplo, un polvo seco). En ciertos casos, algunas de las composiciones pueden ser constituyibles o procesables de otro modo (por ejemplo, en una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otras especies (por ejemplo, agua o un medio de cultivo celular), que puede o no puede proporcionarse con el kit. Como se usa en el presente documento, "instrucciones" puede definir un componente de instrucción y/o promoción, y normalmente implica instrucciones escritas en o asociadas al envase de la invención. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada en cualquier modo de forma que un usuario reconocerá claramente que las instrucciones se van a asociar al kit, por ejemplo, audiovisual (por ejemplo, cinta de vídeo, DVD, etc.), internet y/o comunicaciones basadas en web, etc. Las instrucciones escritas pueden estar en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación,

el uso o la venta de los productos farmacéuticos o productos biológicos, instrucciones que también pueden reflejar la autorización por la agencia de la fabricación, uso o venta de administración humana.

El kit puede contener uno cualquiera o más de los componentes descritos en el presente documento en uno o más recipientes. Como un ejemplo, en una realización, el kit puede incluir instrucciones para mezclar uno o más componentes del kit y/o aislar y mezclar una muestra y aplicar a un sujeto. El kit puede incluir un recipiente que aloja los agentes descritos en el presente documento. Los agentes se pueden preparar de forma estéril, envasar en jeringa y transportar refrigerados. Alternativamente, se pueden alojar en un vial u otro recipiente para su almacenamiento. Un segundo recipiente puede tener otros agentes preparados de forma estéril. Alternativamente, el kit puede incluir los agentes activos premezclados y enviados en una jeringa, vial, tubo, u otro recipiente.

El kit puede tener varias formas, tales como un envase alveolado, un envase retractilado, un envase sellable a vacío, una bandeja termoformada sellable, o una forma de envase o bandeja similar, con los accesorios envasados en forma suelta dentro del envase, uno o más tubos, recipientes, una caja o una bolsa. El kit se puede esterilizar después de añadir los accesorios, permitiendo así que los accesorios individuales en el recipiente estén por lo demás sin envolver. Los kits se pueden esterilizar usando cualquier técnica de esterilización apropiada, tal como esterilización por radiación, esterilización por calor, u otros métodos de esterilización conocidos en la técnica. El kit también puede incluir otros componentes, dependiendo de la aplicación específica, por ejemplo, receptores, medios celulares, sales, tampones, reactivos, jeringas, agujas, una tela, tal como gasa, para aplicar o retirar un agente desinfectante, guantes desechables, un soporte para los agentes antes de la administración, etc.

Las composiciones del kit se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, como disoluciones líquidas o como polvos secos. Cuando la composición proporciona un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado, que también se puede proporcionar. En realizaciones donde se demandan formas líquidas de la composición, la forma líquida se puede concentrar o estar lista para su uso. El disolvente dependerá del compuesto y el modo de uso o administración. Se conocen bien los disolventes adecuados para las composiciones de fármaco y están disponibles en la bibliografía. El disolvente dependerá del compuesto y el modo de uso o administración.

Los kits, en un conjunto de realizaciones, pueden comprender un medio de vehículo que se compartimentaliza para recibir en estrecho confinamiento uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados que se van a usar en el método. Por ejemplo, uno de los recipientes puede comprender un control positivo para un ensayo. Además, el kit puede incluir recipientes para otros componentes, por ejemplo, tampones útiles en el ensayo.

También se describe un producto farmacéutico terminado envasado y etiquetado. Este artículo de fabricación incluye la forma farmacéutica unitaria apropiada en un recipiente apropiado o recipiente tal como un vial de vidrio u otro recipiente que está herméticamente cerrado. En el caso de formas farmacéuticas adecuadas para administración parenteral, el principio activo es estéril y adecuado para administración como una disolución sin partículas. En otras palabras, la invención engloba tanto disoluciones parenterales como polvos liofilizados, siendo cada uno estéril, y siendo el último adecuado para reconstitución antes de inyección. Alternativamente, la forma farmacéutica unitaria puede ser un sólido adecuado para administración oral, transdérmica, tópica o mucosa.

En una realización preferida, la forma farmacéutica unitaria es adecuada para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea. Así, la invención engloba disoluciones, preferentemente estériles, adecuadas para cada vía de administración.

En otra realización preferida, las composiciones se almacenan en recipientes con detergentes biocompatibles, que incluyen, pero no se limitan a, lecitina, ácido taurocólico y colesterol; o con otras proteínas, que incluyen, pero no se limitan a, gamma-globulinas y albúminas de suero.

Como con cualquier producto farmacéutico, el material de envasado y recipiente se diseñan para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el transporte. Además, los productos incluyen instrucciones para su uso u otro material informativo que aconseje al médico, técnico o paciente sobre cómo prevenir o tratar apropiadamente la enfermedad o trastorno en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye instrucciones que indican o sugieren una pauta posológica que incluye, pero no se limita a, dosis real, procedimientos de monitorización.

Más específicamente, se proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado, tal como una caja, botella, tubo, vial, recipiente, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), cubierta y similares; y al menos una forma farmacéutica unitaria de un agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado. Se proporciona además un artículo de fabricación que comprende una aguja o jeringa, preferentemente envasada en forma estéril, para inyección de la formulación, y/o una toallita de alcohol envasada.

## Ejemplos

## Ejemplo 1: Métodos

Síntesis de **nanopartícula de biomarcador**: Se sintetizaron nanogusanos (NG) de óxido de hierro según los protocolos previamente publicados.<sup>[12]</sup> Se sintetizaron péptidos indicadores de sustrato sensible a la trombina (biotina-eGvndneeGffsar(K-Flsc)GGfPRSGGGC, SEQ ID NO: 2, minúsculas = D-isómero) por el servicio de síntesis de péptidos de la instalación principal de la Universidad Tufts. Se hicieron reaccionar primero NG terminados en amina con yodoacetato de succinimidilo (Pierce) para introducir asas reactivas con sulfhidrilo. Entonces se mezclaron péptidos terminados con cisteína y polietilenglicol-SH de 20 kDa (Laysan Bio.) con NG (relación molar 95:20:1) durante una hora a temperatura ambiente (TA) y se purificaron por cromatografía de líquidos de proteína rápida. Se almacenaron las disoluciones madre en PBS a 4 °C. Para estudios farmacocinéticos, se hizo reaccionar primero NG con VT750 (PerkinElmer) antes de la PEGilación como antes. Para ensayos fluorogénicos, se sintetizaron péptidos con fluoresceína en lugar del indicador codificado por ligando. Para monitorizar la actividad de proteasa *in vivo*, se sintetizaron péptidos con VT750 en lugar de la biotina del extremo N.

Se sintetizaron indicadores heterobifuncionales codificados por el ligando R1-4 derivatizando el glutamato-fibrinopéptido B con un ligando de captura (fluoresceína, dinitrofenilo, tetrametilrodamina o Alexa Fluor 488) en el extremo C y un ligando de detección (biotina) en el extremo opuesto. Se sintetizaron nanogusanos (NG, -60 nm) a partir de la reacción de cloruro de hierro (III) hexahidratado y cloruro de hierro (II) tetrahidratado con dextrano (15-25 kDa) como se describió previamente<sup>[28,29]</sup>. Se derivatizaron NG aminados con yodoacetato de N-succinimidilo y se hicieron reaccionar con indicadores sensibles a la proteasa terminados con sulfhidrilo. Se cuantificó la valencia del indicador (~20-30) por absorbancia o ELISA.

Se sintetizaron indicadores heterobifuncionales codificados por ligando R1-4 derivatizando los extremos N de B-biotina de glutamato-fibrinopéptido (GluFib-biotina, secuencia = eGvndneeGffsar-biotina, SEQ ID NO: 1, minúscula = D-isómero, New England Peptide) con NHS-fluoresceína (R1, Pierce), NHS-rodamina (R3, Pierce) o NHS-Alexa Fluor 488 (R4, Invitrogen), en una relación 1:10 de péptido:colorante, o se sintetizaron (R2, New England Peptide). Se sintetizó Alexa Fluor 488-PEG-Biotina (R4, PEG) haciendo reaccionar A488-maleimida (Invitrogen) con NHS-Biotina (Pierce) y NH<sub>2</sub>-PEG-tiol (5 kDa, Laysan) en una relación 10:10:1 de colorante:biotina:PEG y se purificó usando columnas ilustra NAP-25 (GE Healthcare). Los conjugados resultantes se purificaron por HPLC (Gilson). Se cuantificó la concentración de indicador por absorbancia según coeficientes de extinción específicos de colorante en una placa de 96 pocillos por lector de placas (Molecular Devices SpectraMax Plus).

Se conformaron nanogusanos (NG) mediante la reacción de cloruro de hierro (III) hexahidratado y cloruro de hierro (II) tetrahidratado (Sigma) con dextrano (M<sub>r</sub> 15-25 kDa, Fluka) como se describe previamente<sup>[28,29]</sup>. El tamaño hidrodinámico medio por dispersión dinámica de luz (DLS; Malvern Instruments Nano ZS90) fue 60 nm.

Se hicieron reaccionar NG aminados durante la noche con un exceso molar de 500 veces de yodoacetato de N-succinimidilo (SIA, Pierce) durante la noche a 20 °C en borato de sodio 50 mM, pH 8,3, EDTA 5 mM para facilitar el enlace con péptidos terminados en sulfhidrilo. Tras la purificación por cromatografía de líquidos de realización rápida (FPLC, GE Healthcare), se hicieron reaccionar los NG derivatizados por SIA con indicadores conjugados con sustrato (MIT Swanson Biotechnology Center, instalación principal de síntesis de péptidos de la Universidad de Tufts, New England Peptide) y mPEG-tiol (20 kDa; Laysan) en una relación 1:95:20 de NG:péptido:PEG durante la noche a 20 °C en el mismo tampón borato. Se purificaron otra vez los NG funcionalizados con sustrato codificados con indicador y se intercambiaron en 1x PBS por FPLC y se conservaron a 4 °C. Se cuantificó la valencia de sustrato-indicador en NG (normalmente 20-30) por absorbancia o ELISA (se describe más adelante).

Ensayos de proteasa *in vitro*: Se mezclaron NG (200 nM por péptido) con trombina humana (2 µM). FVIIa (10 nM), FIXa (90 nM), FXa (160 nM), FXIa (31 nM) y proteína C activada (60 nM, Haematologic Technologies) en una placa de 384 pocillos a 37 °C en tampones de actividad según las instrucciones del fabricante y se monitorizaron con un lector de microplacas (SpectroMax Gemini EM). Para los estudios de plasma, se mezclaron NG con 50 µl de plasma humano de control (Thermo Scientific) y 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 80 mM (Sigma) o PBS antes de monitorizar la fluorogénesis. Para los experimentos de inhibición de trombina, se añadió bivalirudina (Anaspec) a una concentración final de 5 mg/ml y se preincubó durante dos minutos antes de la adición de NG. Para el análisis de ELISA, se incubaron con trombina NG (100 nM por péptido) durante 10 min a 37 °C y se purificaron los indicadores escindidos (R<sub>1</sub>) de NG por filtración de tamaño centrífugo.

Se introdujeron NG sensibles a trombina o MMP unidos a indicador fluorescente (sustratos PLGLRSW, SEQ ID NO: 3, o PLGVRGK, SEQ ID NO: 4, respectivamente) en trombina recombinante o MMP9 (respectivamente). Se leyó la liberación de fluoróforos homoextinguidos tras la proteólisis como elevada fluorescencia por lector de placas a 37 °C. Se incubaron los inhibidores argatroban o marimastat con la mezcla de proteasa-NG a 100 µM. Para cuantificar la liberación de indicador por EFL, se incubaron NG funcionalizados con indicador con proteasas relacionadas, se pasaron a través de un filtro de corte 30 kDa de MW, se cuantificaron por EFL y se analizaron por la prueba de Mann-Whitney.

Se mezclaron NG sensibles a MMP o trombina funcionalizados con fluoresceína (2,5 µM por péptido) en 1 % p/v de

BSA (Sigma) con trombina recombinante (15 nM; Haematologic Technologies) o MMP9 (15 nM; R&D Systems) en un volumen final de 100 µl en una placa de 384 pocillos por instrucciones del fabricante y se monitorizó a 37 °C el aumento en la señal fluorescente debido a la liberación enzimática de indicadores homoextinguidos (lector de microplacas SpectroMax Gemini EM). Se incubaron argatroban (Sigma) o marimastat (Tocris) con la mezcla NG-proteasa en concentración final de 100 µM. Para ensayar la liberación de indicador proteolítico por EFL, se incubaron NG sensibles a enzimas funcionalizados con indicador con MMP9 o trombina como antes a 37 °C durante cuatro horas y se pasaron a través de un filtro centrífugo de corte de 30 kDa de MW. Se diluyeron los indicadores filtrados hasta en el intervalo dinámico de LFA y se ensayaron por EFL como se describe a continuación. Se realizaron experimentos de estabilidad de indicador usando el indicador 3 (1 µM) mezclado en 1 % p/v de BSA con trombina recombinante o MMP9 (ambos 15 nM) como antes hasta 100 µl de volumen final y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Después de esto, los indicadores se pasaron a través de un filtro centrífugo de corte de 30 kDa de MW como antes y se ensayaron por ELISA de R3.

**Detección de ELISA de indicadores bifuncionalizados:** Se incubaron placas de 96 pocillos (Thermo Scientific) con o 0,8 µg/ml de anti-Flsc (GeneTex, GTX19224) o 0,4 µg/ml de anti-Alex Fluor 488 (Invitrogen, A11094) diluido en PBS durante la noche a 4 °C. Se bloquearon las placas con 1 % p/v de albúmina de suero bovino (Sigma) en PBS durante 1 h antes de que se añadieran muestras de 100 µl. Entonces se detectaron los indicadores capturados sobre la placa añadiendo 100 µl de 0,2 µg/ml de neutravidina-HRP (Pierce), se revelaron con 50 µl de disolución TMB (Thermo Scientific) durante 5-15 minutos y se extinguieron con 50 µl de HCl antes de determinar la absorbancia de los pocillos por análisis de microplacas (SpectraMax Plus, Molecular Devices) a 450 nm. Se lavaron las placas 3x con PBST entre cada etapa y la incubación ocurrió a TA a menos que se estableciera de otro modo.

**Caracterización de la trombosis inducida por tromboplastina:** Se disolvió cada vial de tromboplastina que contenía 3-4 mg (de cerebro de conejo, Sigma) en 2 ml de PBS. Para cuantificar la deposición de fibrina, se hizo reaccionar fibrinógeno bovino (Sigma) con un exceso molar triple de VT750 durante 1 h a TA, y se purificó por filtración de tamaño centrífugo (corte de tamaño, Millipore). Se anestesiaron ligeramente ratones Webster suizos (Taconic) con isoflurano y se les administró mezclas de VT750-fibrinógeno (1 nmol por VT750) con tromboplastina (n = 3 ratones por dosis) por inyección en las venas de la cola. Después de 30 minutos, se sacrificaron los ratones por asfixia con CO<sub>2</sub> y se barrieron los órganos en el sistema de obtención de imágenes de infrarrojos LI-COR Odyssey. Se cuantificó la fluorescencia de fibrina (fibrinógeno) en cada órgano usando el software ImageJ (NIH). Para probar la inhibición de trombina, se administró bivalirudina a los ratones por vía intravenosa (10 mg/kg) cinco minutos antes de la inyección simultánea de tromboplastina. Para histología, se inflaron los pulmones con 4 % de paraformaldehído mientras que todos los órganos se incubaron en 4 % de paraformaldehído durante 1-2 horas a TA. Todos los órganos se almacenaron en 70 % de etanol hasta que se incorporaron en parafina, se seccionaron y se tiñeron (Koch Institute Histology Core).

**Farmacocinética de NG.** Para analizar la farmacocinética de NG y péptidos, se administraron ratones o con NG marcados con VT750 o NG conjugados con péptidos marcados con VT750 (600 nM por péptido) junto con tromboplastina (dosis) y se obtuvieron imágenes de los órganos extirpados en el sistema de obtención de imágenes IVIS (Xenogen). Para analizar las secciones de tejido por inmunotinción, se administraron NG (600 nM por péptido) y tromboplastina (2 µl/g de p.c.) a ratones y se recogieron los órganos principales después de 30 minutos. Se inflaron los pulmones con 4 % de paraformaldehído antes de la congelación y se seccionaron en OCT. Se tiñeron secciones representativas para NG (anti-Flsc primario, Genetex GTX19224), fibrina (Nordic GAM/Fbg/Bio) y Hoechst (Invitrogen, H3569) antes del análisis por microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti).

**Efecto del estado de hidratación sobre la concentración de orina.** Se sintetizó el indicador libre R<sub>2</sub> (biotina-eGvndneeGffsar(K-AF488), SEQ ID NO: 1) por el servicio de síntesis de péptidos de la instalación central de la Universidad Tufts. Se anestesiaron los ratones (n=5 ratones) y se inyectaron por vía subcutánea con un bolo de PBS equivalente al 10 % de sus pesos corporales. Después de dos horas, se administró R<sub>2</sub> (125 nM) a los ratones por una inyección en la vena de la cola. Se dispusieron los ratones sobre placas de 96 pocillos rodeadas por manguitos cilíndricos durante 30 minutos después de la inyección de NG para permitir que evacuaran los ratones. Se almacenaron muestras de orina a -80 °C hasta los análisis de ELISA.

**Monitorización urinaria de la trombosis.** Se realizaron experimentos en una configuración por parejas. Se inyectaron simultáneamente NG sensibles a la trombina (600 nM por péptido) y R<sub>2</sub> (125 nM) en ratones sanos (n=5-10 ratones) para determinar los niveles actividad de proteasa de fondo (día 0) y se dispusieron sobre placas de 96 pocillos para recoger la orina. Cinco días después, se volvieron a administrar los ratones con NG, R<sub>2</sub> y tromboplastina antes de recoger la orina de los ratones 30 minutos después de la inyección de NG. Para los experimentos de inhibición de trombina, se administró bivalirudina (10 mg/kg) a los ratones por vía intravenosa cinco minutos antes de las inyecciones de NG/R<sub>2</sub>. Se almacenaron muestras de orina a -80 °C hasta el análisis de ELISA.

**Análisis estadísticos.** Se calcularon los análisis de ANOVA y la prueba de la *t* de Student con GraphPad 5.0 (Prism). Se calculó el coeficiente *r* de Pearson con Excel (Microsoft Office).

**Obtención de imágenes in vivo.** Todos los estudios en animales fueron autorizados por el comité de MIT sobre cuidado animal (protocolo 0411-036-14). Se funcionalizaron NG sensibles a trombina o MMP con indicador fluorescente de infrarrojos VT-750. Se obtuvieron imágenes de la localización de vejiga y/o pulmón de indicador fluorescente

proteolíticamente liberado en ratones de control y enfermos. Se indujo la trombosis por coinyección de colágeno y epinefrina con biomarcadores sintéticos en ratones Webster suizos hembra; se indujeron tumores colorrectales del flanco por inyección subcutánea de la línea celular humana LS147T en ratones NCr sin pelo hembra.

- 5 Se prepararon biomarcadores sintéticos para la obtención de imágenes *in vivo* haciendo reaccionar grupos amina libres en NG sensibles a MMP o trombina (tanto en los extremos N del sustrato como en NG) con VivoTag 750-NHS (Perkin Elmer) y se purificaron por FPLC.

- 10 Se cultivaron células de cáncer colorrectal LS147T humanas en medio Eagle modificado por Dulbecco (ATCC) complementado con 10 % de FBS (Gibco) y 1 % de penicilina-estreptomicina (CellGro). Se inoculó ratones NCr sin pelo hembra (4-6 semanas; Taconic) por vía subcutánea con  $5 \times 10^6$  linfocitos T LS147/flanco y se dejó que crecieran hasta aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^3$  de carga total (volumen=longitud\*anchura\*profundidad/2). Se infundió por vía intravenosa ratones de control portadores de tumor y de edades equiparadas con 200  $\mu\text{l}$  de NG sensibles a MMP marcados con VivoTag y FAM (1,67  $\mu\text{M}$  por sustrato), que permitió la visualización por un sistema de obtención de imágenes *in vivo* (IVIS, Xenogen) 5-60 m después de la infusión. Para histología, se sacrificó a los ratones 1 h después de la infusión. Se retiraron los tumores, se fijaron en 4 % de paraformaldehído, se congelaron en OCT (Tejido-Tek), se cortaron en secciones y se tiñeron con anti-CD31 de rata (Santa Cruz), DAPI (Invitrogen) y anti-FAM de cabra (GeneTex) antes de la obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti).

- 20 Para modelar la trombosis, se infundieron simultáneamente ratones Webster suizos hembra (4-6 semanas; Taconic) con 200  $\mu\text{l}$  de NG sensibles a trombina marcados con VivoTag y FAM (0,84  $\mu\text{M}$  por péptido), 10  $\mu\text{g/kg}$  de epinefrina (Sigma) y 280  $\mu\text{g/kg}$  de colágeno (Chronolog). 15 minutos después de la inducción, se sacrificó a los ratones y se inflaron sus pulmones con PBS y se extirparon. Se tomaron imágenes fluorescentes de los pulmones por infrarrojos usando un generador de imágenes de infrarrojos LI-COR Odyssey. Los sustratos para péptidos fueron PLGLRSW (SEQ ID NO: 3) para trombina y PLGVRGK (SEQ ID NO: 4) para MMP<sup>[30]</sup>.

- 30 **Caracterización del ensayo de ELISA.** Se adsorbieron placas de 96 pocillos con anticuerpos de captura y se bloquearon con 1 % de BSA en 1x PBS. Se aplicaron patrones de indicador y se detectaron mediante la adición de neutravidina-peroxidasa de rábano picante. La oxidación del sustrato cromogénico TMB durante 1-5 m permitió la cuantificación de la concentración de indicador. Todas las incubaciones fueron 1 h y las placas se lavaron con 1x PBS con 0,5 % p/v de Tween 20 entre etapas. Se ensayó la interferencia de orina enriqueciendo R1 en orina de ratón de control 1:100. Se midió la especificidad del ensayo cuantificando la especificidad de captura de cada anticuerpo por todos los indicadores y normalizando la señal con respecto a una escalera de indicador relacionado.

- 35 Se adsorbieron anticuerpos anti-fluoresceína de ratón (GeneTex), anti-DNP de conejo y anti-A488 de conejo (Invitrogen) y anti-rodamina de ratón (Rockland) a placas Bacti de 96 pocillos (Termo) a concentraciones 0,4-0,8  $\mu\text{g/ml}$  durante 1 h en 1x PBS. Entonces se bloquearon las placas durante 1 h con 1x PBS con 1 % p/v de BSA (Sigma). Se aplicaron patrones de indicador a placas bloqueadas en diluciones sucesivas dobles en 100  $\mu\text{l}$  de volumen durante 1 h para caracterizar la linealidad del ensayo. Para detectar los indicadores, se aplicaron 100  $\mu\text{l}$  de 0,4  $\mu\text{g/ml}$  de neutravidina-HRP (Pierce) durante 1 h. Se expuso HRP unida con 50  $\mu\text{l}$  de Ultra-TMB (Pierce) durante 1-5 m seguido por extinción con 50  $\mu\text{l}$  de HCl 1 N. Entre cada etapa, se lavaron las placas 3x con 1x PBS con 0,5 % v/v de Tween 20 (Sigma). Se midió la absorbancia a 450 nm, se representó contra la concentración de indicador conocido y se usó para generar un ajuste lineal en la región de absorbancia lineal del ensayo. Se calculó el límite de detección (LOD) del ensayo como tres desviaciones estándar por encima de la señal de fondo media.

- 45 Para probar la interferencia debido a la orina, se añadió orina de ratones no tratados al patrón R1 en una dilución 1:100. Para cuantificar la especificidad del ensayo, se aplicaron concentraciones de indicador en el pico de cada región lineal del indicador en cada uno de los cuatro anticuerpos de captura y se completó el ELISA como normal. Se cuantificó la señal para cada uno de los cuatro tipos de anticuerpo de captura por comparación con una escalera patrón y se normalizó con la señal máxima de indicadores capturados por su anticuerpo relacionado.

- 50 **Caracterización del ensayo de flujo lateral en papel.** Se imprimieron anticuerpos de captura (mismos que para ELISA) o de control ( $\alpha$ -estreptavidina) en líneas separadas 2 mm con gotitas de 50 nl a 0,5 mm de pocillo sobre membrana de éster de celulosa. Se laminaron las membranas sobre un sustrato de plástico con conjugado de fibra de vidrio y almohadillas absorbentes. Se cortó la construcción resultante en tiras de 4 mm y se conservaron a 4 °C. Los indicadores diluidos 1:1 en orina se aplicaron a la almohadilla de conjugado y se lavaron con tampón de lavado (1x PBS con 1 % p/v de Tween 80). Se detectaron indicadores usando 40 nm de nanopartículas de estreptavidina-oro. Se barrieron las tiras secadas y se procesaron por una secuencia de comandos personalizada que integró y cuantificó la intensidad de bandas.

- 60 Se imprimieron en líneas los anticuerpos (mismos que antes) separados 2 mm usando gotitas de 50 nl a 0,5 mm de pocillo (Digilab MicroSys) sobre membrana de éster de celulosa HiFlow Plus (240 s/4 cm de caudal, Millipore). Las líneas de control fueron anticuerpo anti-estreptavidina (Abcam) a 0,5 mg/ml, mientras que los anticuerpos de captura indicadores fueron los mismos que para el ELISA y se aplicaron a 1 mg/ml ( $\alpha$ R1,  $\alpha$ R3,  $\alpha$ R4) o 2 mg/ml de ( $\alpha$ R2). Se laminó la membrana de celulosa (Millipore) sobre un sustrato de plástico. Se laminó la almohadilla de conjugado de fibra de vidrio de 10 mm (Millipore) con la cara de muestra de la membrana de celulosa y se laminaron almohadillas

de fibra de celulosa de 20 mm a tanto la cara de muestra de la almohadilla de conjugado como el extremo de escurrimiento de la membrana de celulosa. Se cortó la construcción resultante en tiras de 4 mm que se conservaron a 4 °C.

Se aplicaron diluciones dobles de patrones de marcador en 1x PBS con 1 % p/v de BSA con 1:1 de orina de control enriquecida a la almohadilla de conjugado y se lavaron con 200 µl de tampón de lavado (1x PBS con 1 % p/v de Tween 80) sobre la almohadilla de muestra. Para detectar los marcadores, se aplicaron 5 µl de nanopartículas de oro conjugadas con estreptavidina (40 nm; BBI International) a la almohadilla de conjugado y se lavaron con 200 µl adicionales de tampón de lavado. Se dejaron secar las tiras reactivas y se pudieron visualizar a simple vista o se aplicaron a un molde de escala y se barrieron (600 dpi; Epson V330 Photo) o se obtuvieron imágenes por el teléfono móvil (Samsung Galaxy Nexus). Se cargaron las imágenes resultantes en MATLAB (MathWorks) y se procesaron por una secuencia de comandos personalizada que integró la señal con respecto a los antecedentes a través de cada línea de anticuerpo. Se caracterizó la ortogonalidad del marcador comparando la captura del indicador por cada anticuerpo aplicando un único indicador y cuantificando la señal con respecto al ruido de fondo a través de cada línea de anticuerpo. Todas las tiras se realizaron en al menos por triplicado.

**Recogida y análisis de péptidos urinarios.** Se recogió orina de ratones por vía intravenosa infundidos con mezclas de biomarcadores sintéticos (R4 libre más o NG sensibles a trombina funcionalizados con R3 para detectar trombosis o NG sensibles a MMP funcionalizados con R2 para detectar CRC) durante 30 o 60 m después de la inyección (para detectar trombosis o CRC, respectivamente). Se optimizaron los tiempos de recogida de orina de estudios previos usando estos modelos de enfermedad<sup>[30, 31]</sup> y dependen del sitio de enfermedad y la tasa de escisión del sustrato enzimático. Se ensayó la concentración de indicador en orina no procesada por los protocolos anteriores de orina diluida 1:10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> para ELISA o 1:4-5 para EFL. Se analizaron los datos usando curvas de eficacia diagnóstica (ROC) (ambas) y la prueba del orden con signo de Wilcoxon (CRC) o prueba de Mann-Whitney (trombosis).

Se infundió por vía intravenosa ratones con 200 µl de PBS con R4 (A488-PEG-Biotina, modelo de trombosis: 0,125 µM, modelo de CRC: 1 µM) como control de inyección y o NG sensibles a MMP funcionalizados con R2 (1,67 µM por péptido; volumen del tumor ~0,5 cm<sup>3</sup>) o NG sensibles a trombina funcionalizados con R3 (0,84 µM por péptido; trombosis modelo). Inmediatamente después de la infusión, se dispusieron los ratones sobre placas de 96 pocillos encerrados por un tubo cilíndrico para recoger orina durante 30 m (modelo de trombosis) o 1 h (modelo de tumor). Se optimizaron los tiempos de recogida de orina de los estudios previos usando estos modelos de enfermedad<sup>[30, 31]</sup> y dependen del sitio de enfermedad y la tasa de escisión por sustrato enzimático. Se almacenó la orina a -80 °C directamente después de la recogida.

Se diluyó la orina no procesada (1:100 - 1:10.000) en 1x PBS con 1 % p/v de BSA y se cuantificaron por ELISA los indicadores (al menos 2 duplicados) usando patrones como se ha descrito anteriormente. Se aplicó orina a tiras reactivas de flujo lateral en un volumen de 5 µl de volumen, una dilución 1:4 (modelo de trombosis) o 1:5 (modelo de CRC). Se realizaron por triplicado pruebas de flujo lateral como se ha descrito anteriormente y las tiras reactivas se dejaron secar y se cuantificaron por secuencia de comandos automática como se ha descrito anteriormente. Se analizaron los datos de ELISA y de EFL usando una prueba del orden con signo de Wilcoxon (CRC) y una prueba de Mann-Whitney (trombosis).

**Inyectable y análisis diagnósticos con fines terapéuticos.** Se han diseñado biomarcadores sintéticos a modo de ejemplo a partir de materiales ampliamente usados para varios fines comerciales. Se usan ampliamente muchos de estos materiales en fármacos y productos médicos y están fácilmente y económicamente disponibles (óxido de hierro, dextrano, poli(etilenglicol), fluoresceína, biotina y péptidos 25-meros compatibles con la síntesis en fase sólida). En el diseño de la plataforma de biomarcadores sintéticos, se usaron las estrategias de acoplamiento normalizado compatibles con la síntesis en fase sólida (reticulante heterobifuncional yodoacetato de succinimidilo (SIA) para acoplar restos de cisteína que contienen tiol en los péptidos con dextrano aminado sobre los nanogusanos de óxido de hierro). La globalización y el elevado volumen de síntesis debido a fármacos de péptido comercialmente satisfactorios han producido una empinada caída en los costes de la síntesis de péptidos. Se pueden extrapolar dosis humanas de los estudios de ratón para ser aproximadamente ~0,16 mg/kg.

Los biomarcadores sintéticos a modo de ejemplo descritos en el presente documento se administran a -12 nmol/kg en ratones (~1,5 µM en 200 µl en un ratón de 25 g), como se cuantificó por la valencia indicadora (0,4 pmol/kg por núcleo de óxido de hierro). Se aproxima que cada biomarcador sintético tiene una valencia de péptido de 30 (3 kDa cada uno) y una valencia de recubrimiento de poli(etilenglicol) (PEG) de 10 (20 kDa cada uno) en cada nanogusano de 115 kDa. En el individuo de 62 kg promedio (Walpol et al. BMC Public Health 2012), esto es una dosis total de 10,0 mg, de los que 2,9 mg es nanogusanos, 5,0 mg es PEG y 2,2 mg es péptido.

**Ejemplo 2: Las nanopartículas de biomarcador detectan específicamente la actividad proteolítica de trombina dentro del medio complejo de plasma.**

Se diseñaron biomarcadores sintéticos diseñados para estudiar sitios intravasculares para trombosis aguda, la activación de una cascada de actividad de proteasa que orquesta la formación de coágulos de sangre obstructivos dentro de los vasos, (**Figura 1A**). Los trombos son una característica patofisiológica crítica de numerosas

enfermedades vasculares que incluyen síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular y tromboembolia venosa.<sup>[7]</sup> La serina proteasa más importante en la cascada de la coagulación es la trombina, que no solo cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina que sirve de armazón estructural de un coágulo, sino que también regula la hemostasia a través de circuitos de retroalimentación positivos y negativos.<sup>[8]</sup> Hasta la fecha, varios estudios han descrito el uso de sondas fluorogénicas de infrarrojos cercano para detectar la actividad de la trombina en el entorno de la formación de trombos, así como otras enfermedades dependientes de trombina tales como aterosclerosis.<sup>[9]</sup> Más recientemente, estas sondas se han modificado para incluir mecanismos penetrantes en las células que se activan después de la escisión para mejorar la retención del agente de obtención de imágenes y el mantenimiento de la señal de detección.<sup>[9c, 10]</sup> En la clínica, el biomarcador de la sangre D-dímero, un subproducto de la degradación de fibrina, se usa frecuentemente como indicador de la trombosis; sin embargo, esta prueba es altamente susceptible a artefactos introducidos por una extracción de sangre, tiene mala especificidad y refleja con más exactitud la plasmina (es decir, fibrinólisis) en vez de la actividad de la trombina.<sup>[11]</sup>

Se han desarrollado nanopartículas que estudian la vasculatura del hospedador para trombos. En respuesta a la actividad de la trombina, estas nanopartículas de la invención liberan indicadores en la orina como una medida integrada de la carga de agregados de los coágulos sistémicos. Se describe en el presente documento un método de codificación de estos indicadores con ligandos estructuralmente distintos que permiten la detección basada en anticuerpos por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) en placas de 96 pocillos normalizadas que hace que esta plataforma sea fácilmente susceptible para su uso en laboratorios clínicos.

La construcción de biomarcadores sintéticos para trombosis implica modificar la superficie de nanogusanos de óxido de hierro (NG) con péptidos en tándem indicadores de sustrato que son escindibles por trombina y detectables por ELISA (**Figura 1A**).<sup>[6, 12]</sup> Se muestra en la Figura 13 un esquema general de la síntesis y el uso de las nanopartículas de biomarcador de la invención. Para desarrollar en primer lugar un sustrato adecuado, se extendió la secuencia escindible de trombina fPR-x-S (x = sitio de escisión,  $k_{cat}/K_m \sim 9,33 \times 10^6$ )<sup>[13]</sup> para incluir espaciadores de glicina y una cisteína del extremo C para permitir el acoplamiento a NG por una química de sulfhidrilo.<sup>[12]</sup> Para probar la especificidad por sustrato, se conjugaron derivados marcados con fluoróforo sobre NG en una valencia suficiente para producir sustratos homoextinguidos (~40 péptidos por NG) y luego se incubaron los NG con trombina purificada o un panel de proteasas de coagulación de la sangre (FXa, APC, FIXa, FVIIa, FXIa), cada una presente en su concentración fisiológica máxima durante la trombosis (**Figura 1B**). Los fragmentos de péptido libremente emisores que se liberaron por actividad de la trombina aumentaron la fluorescencia de la muestra en más de 25 veces en diez minutos (rojo, **Figura 1C**). Por el contrario, se observó proteólisis despreciable del panel de proteasas no relacionadas, así como por trombina en presencia de bivalirudina (Bival), un inhibidor de la trombina directo clínicamente autorizado.

Para investigar más la capacidad para detectar la actividad de la trombina de la sangre, se enriquecieron NG en muestras de plasma humano inactivadas con citrato de sodio (un anticoagulante que quela el cofactor calcio) y se monitorizó la fluorescencia en plasma después de la adición de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) en exceso para desencadenar la coagulación o solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control. La fluorescencia del plasma aumentó notablemente después de la activación de la cascada de coagulación, pero no en muestras de control o en presencia de bivalirudina (**Figura 1D**). Conjuntamente, estos resultados establecen la capacidad de los NG para detectar específicamente la actividad proteolítica de trombina dentro del medio complejo de plasma.

### Ejemplo 3: Las estructuras de la invención son capaces de monitorizar la actividad de proteasa

Los presentes inventores construyeron un sistema de indicadores codificados por ligando que permitiría la cuantificación de la actividad de proteasa en un formato de 96 pocillos por ELISA, la principal plataforma de detección para muchas pruebas clínicas. Los ELISA convencionales detectan un analito diana por un complejo de sándwich compuesto de dos agentes de afinidad que se unen a epítopes distintos sobre el analito (**Figura 2A**). Para construir un indicador sintético, se modificó el péptido resistente a proteasa glutamato-fibrinopéptido B (Glu-fib, secuencia = eGvndneeGffsar (SEQ ID NO: 1), minúscula = D-isómero) - que los presentes inventores seleccionaron para su eficiencia de alta eliminación renal<sup>[14]</sup> - en los extremos con ligandos estructuralmente distintos (es decir, Flsc o AF488) y biotina ( $R_1$  y  $R_2$  marcados, respectivamente; **Figura 2A**). Estos indicadores se enriquecieron entonces en orina y se aplicaron a placas de 96 pocillos previamente recubiertas con anticuerpos de captura ( $\alpha$ -Flsc o  $\alpha$ -AF488) antes de que la presencia de  $R_1$  o  $R_2$  se detectara por la adición de neutravidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y su desarrollo catalítico de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Como se predijo a partir de las especificidades de los anticuerpos, solo apareció un cambio significativo en el color en los pocillos que contenían pares anticuerpo-ligando equiparados (+/- o +/- pocillos, **Figura 2B**) y no se afectó por la presencia de indicadores no relacionados (+/- pocillos). Se observaron tendencias idénticas en los límites de detección para ambos anticuerpos de captura (~3 pM, **Figura 2C**, **Figura 5**), que indica que los indicadores sintéticos se detectaron con alta especificidad y sensibilidad comparable con ELISA basados en proteína.<sup>[15]</sup> Con un sustrato de trombina optimizado y un sistema de indicador en el sitio, entonces se incubaron los NG decorados con la construcción de péptidos en tándem final (secuencia = biotina-eGvndneeGffsar(K-Flsc)GGPRSGGGC, SEQ ID NO: 2, **Figura 6**) con niveles de trombina crecientes y se encontró que la cantidad de productos de escisión liberados en disolución (aislados por filtración por tamaño) era correspondientemente dependiente de la dosis, estableciendo la capacidad para monitorizar la actividad de la trombina por ELISA (**Figura 2D**). Conjuntamente, estos resultados indican que se puede usar la especificidad de interacciones ligando-anticuerpo para construir paneles de indicadores ortogonales para monitorizar la actividad de proteasa por

ensayos normalizados de 96 pocillos.

#### **Ejemplo 4: Las nanopartículas de biomarcador detectan trombosis *in vivo*.**

Los presentes inventores investigaron a continuación la capacidad de los biomarcadores sintéticos para detectar trombosis en ratones vivos inducida por la administración intravenosa (i.v.) de tromboplastina. Este modelo se ha explorado en la bibliografía de la hematología para explorar la función que diferentes receptores vasculares desempeñan en la susceptibilidad del hospedador a la trombosis y para investigar la eficacia de nuevos agentes antitrombóticos.<sup>[16]</sup> La tromboplastina desencadena la cascada de coagulación a través de la vía extrínseca por la complejación de factor tisular y factor VII, y los coágulos de la sangre embolizan en gran medida los pulmones, resumiendo el estado clínico potencialmente mortal de la embolia pulmonar (EP). Para cuantificar la formación de EP, los ratones se inyectaron conjuntamente con tromboplastina y el fibrinógeno precursor de los coágulos (marcado con el fluoróforo de infrarrojos cercano VT750) de manera que la formación de los coágulos de fibrina por la proteólisis mediada por trombina del fibrinógeno se pueda cuantificar por análisis de fluorescencia de los órganos complejos (**Figura 3A**). En el plazo de 30 minutos desde la administración (dosis = 2 µl por g de p.c.), se observó un aumento superior a 6 veces en el nivel de fibrina (fibrinógeno) depositado dentro de los pulmones y una disminución significativa en los riñones e hígado ( $P < 0,005$  por prueba de la  $t$  de Student,  $n = 3$  ratones; **Figura 3B**), de acuerdo con los patrones de circulación sanguínea venosa que transportan trombos formados tras la administración i.v. directamente a los pulmones desde el corazón. El análisis histoquímico de secciones de tejido corroboró estos hallazgos revelando la presencia de coágulos de sangre en secciones de pulmón (flecha, **Figura 3C**) que estuvieron ausentes en los otros órganos principales (cerebro, corazón, riñón, hígado y bazo; **Figura 7**) y en animales de control. Los animales administrados con dosis cada vez mayores pero inferiores a las letales (DL50 observada ~ 3 µl por g de p.c.) de tromboplastina acumularon fibrina (fibrinógeno) en los pulmones en proporción a la dosis y las EP se previnieron fácilmente en animales pretratados con bivalirudina ( $P < 0,005$  por ANOVA unilateral con prueba posterior de Tukey,  $n = 3-5$  ratones; **Figura 3D**, **Figura 8**), que confirmó que la formación de coágulos es en gran medida guiada por la actividad de la trombina. Por completo, estos resultados establecieron la capacidad para controlar con precisión la carga total de coágulos en un modelo que se parece a la patología clínica de la trombosis venosa.<sup>[16b, 17]</sup> En la trombosis arterial, las plaquetas activadas pueden desempeñar una mayor función que la trombina en el reclutamiento de fibrinógeno como se evidencia por su tratamiento con terapias antiplaquetarias.<sup>[18]</sup> La aplicabilidad de esta plataforma a la trombosis motivada por plaquetas se puede probar empleando modelos basados en la inyección sistémica de agentes de agregación de plaquetas tales como colágeno/epinefrina o ADP.<sup>[16b, 19]</sup>

#### **Ejemplo 5: Las nanopartículas de biomarcador pueden estudiar por vía sistémica la vasculatura para actividad de la trombina y liberar indicadores en sitios de trombosis que entonces se eliminan eficientemente en la orina del hospedador.**

A continuación, los presentes inventores caracterizaron la farmacocinética de los biomarcadores sintéticos en el contexto de la trombosis. Se inyectaron mezclas de NG directamente marcadas con VT750 y tromboplastina en ratones y no observaron diferencias significativas en la distribución de NG entre los grupos de tromboplastina y de control en todos los órganos extirpados -que incluyen los pulmones- que indica que la trombosis no alteró la biodistribución del armazón de NG ( $P > 0,05$  por prueba de la  $t$  de Student,  $n = 3$  ratones; **Figura 4A**, **Figura 9**). Para monitorizar la escisión de péptidos y el tráfico de los fragmentos escindidos, los presentes inventores administraron conjuntamente NG conjugados con sustratos fluorescentemente extinguidos (marcados con VT750) y observaron aumentos significativos en la fluorescencia en los pulmones y riñones en ~1,8 y ~2,5 veces con respecto a los animales sanos, respectivamente ( $P < 0,01$  por prueba de la  $t$  de Student,  $n = 3$  ratones; **Figura 4B**, **Figura 10**). A la par con las observaciones previas de los presentes inventores que muestran que la tromboplastina no alteró la biodistribución de los NG e indujo coágulos de sangre que se localizaron en el pulmón (es decir, los coágulos no se encontraron en los riñones), este hallazgo proporcionó evidencia de la escisión de péptidos en los pulmones (por su elevada fluorescencia) y acumulación renal de fragmentos fluorescentes libremente emisores. La tinción inmunofluorescente de secciones de pulmón adicional mostró co-localización de NG con fibrina, los sitios de coagulación, que estaba ausente en secciones de control (**Figura 11**), que respalda la hipótesis de que los NG circulantes pueden acceder a los trombos locales. Para visualizar las eficiencias de eliminación de los fragmentos de péptido, los ratones se monitorizaron por obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* y observaron un fuerte aumento en la señal fluorescente que se localizó en la vejiga de ratones trombóticos con respecto a los controles (**Figura 4C**). Tomados conjuntamente, los datos ilustran que las nanopartículas de biomarcador de la invención pueden estudiar por vía sistémica la vasculatura para la actividad de la trombina y liberar indicadores en sitios de trombosis que entonces se eliminan eficientemente en la orina del hospedador.

#### **Ejemplo 6: Las nanopartículas de biomarcador pueden monitorizar la actividad de la trombina en ratones vivos y medir cuantitativamente la carga de agregados de EP subletales de la orina por ELISA.**

La concentración de analitos en la orina depende principalmente del estado de hidratación del hospedador (que varía desde 50-1200 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O en seres humanos)<sup>[20]</sup> y está afectada por muchos factores externos (por ejemplo, ritmo circadiano, dieta, actividad y otros). Los enfoques para determinar la concentración de orina incluyen medir el nivel de creatinina,<sup>[21]</sup> un subproducto del metabolismo muscular que filtra la orina en un estado estacionario cuando está en reposo, o administración i.v. de inulina,<sup>[22]</sup> un polisacárido que no se absorbe o secreta activamente por los

riñones y cuya aparición en la orina se relaciona directamente con la tasa de producción de orina. Se supone que debido a que los indicadores libres ( $R_1$ ,  $R_2$ ) se forman a partir de Glu-fib que es asimismo biológicamente inerte,<sup>[14]</sup> su filtración en la orina tras la administración i.v. sería indicativa de la concentración de orina. Para probar esto, se midieron los niveles urinarios de  $R_2$  en ratones que recibieron un bolo subcutáneo de solución salina equivalente a 10 % de su peso corporal para crear un estado de sobre-hidratación y se encontró que se diluyó en ~50 % en comparación con ratones no hidratados a los que se les permitió beber a voluntad ( $P < 0,005$  por prueba de la  $t$  de Student, **Figura 12A**). El volumen de orina recogido durante el periodo experimental (~2,5 horas) también aumentó en más de 2,5 veces ( $P < 0,005$  por prueba de la  $t$  de Student, **Figura 12B**), que mostraron juntos que los indicadores libres se podrían usar para monitorizar el estado de hidratación y la concentración de orina de los animales. Los presentes inventores buscaron a continuación monitorizar las EP inducidas por tromboplastina por el análisis de orina de la respuesta de los biomarcadores sintéticos a la actividad de la trombina. Para simular la monitorización en serie que ocurre frecuentemente en ámbitos hospitalarios, los presentes inventores determinaron primero la actividad basal en cohortes sanas de animales que recibieron cada NG sensible a trombina y un indicador libre ( $R_2$ ) para la normalización de la orina (**Figura 4D**). Después de cinco días para permitir que los NG se eliminaran completamente (semivida ~6 horas),<sup>[9]</sup> se administró una mezcla de tromboplastina, NWS y  $R_2$  a los mismos ratones y se cuantificaron los niveles de indicador por ELISA. Cuando se comparó con su estado sano (día 0), la inducción de EP (día 5) produjo elevaciones significativas de hasta tres veces en el nivel de fragmentos de escisión urinaria ( $P < 0,005$  por ANOVA bilateral con Bonferroni después de la prueba,  $n = 5$  ratones; **Figura 4D**). En ratones tratados con bivalirudina antes de la exposición trombótica (dosis = 2  $\mu$ l por g de p.c.), se suprimieron los niveles de indicadores, de acuerdo con resultados tempranos que muestran la capacidad de la bivalirudina para inhibir la actividad de la trombina y prevenir la formación de EP. Cuando los niveles de marcadores de biomarcadores urinarios de ratones expuestos a tromboplastina se normalizaron con sus muestras de orina sanas recogidas del día 0 (**Figura 13**) y se compararon directamente con la cantidad de fibrina (fibrinógeno) depositada en dosis idénticas de tromboplastina (**Figura 3D**), se encontró una notable correlación con la carga de enfermedad con un coeficiente de correlación de 0,99 ( $r$  de Pearson, **Figura 4E**). Conjuntamente, los hallazgos mostraron que los biomarcadores sintéticos pueden monitorizar la actividad de la trombina en ratones vivos y medir cuantitativamente la carga de agregados de las EP subletales de la orina por ELISA.

#### Ejemplo 7: Demostración de la escisión específica *in vivo* usando ELISA.

Para desarrollar nanopartículas sensibles a proteasa, los presentes inventores seleccionaron dos sustratos de péptido (B6 y B7 respectivamente) que se informó previamente que eran específicos de trombina y MMP9 y demostraron la capacidad respectiva para la escisión por proteasas recombinantes (es decir, trombina y MMP9) en un ensayo fluorogénico de nanopartículas (**Fig. 14a,b**). La trombina, una proteasa circulante implicada en la coagulación, se activa fuertemente durante la trombosis mientras que MMP9, una enzima degradadora de la matriz, se desregula frecuentemente en muchos cánceres sólidos. En modelos de ratón de trombosis o cáncer colorrectal, se observó una acumulación significativa de fragmentos de escisión fluorescentemente marcados en la orina del hospedador tras la infusión intravenosa de nanopartículas específicas de trombina o MMP9 (**Fig. 14c**).

Para construir un indicador basado en ligando, los presentes inventores modificaron primero el armazón de péptidos prototípico glutamato-fibrinopéptido B (GluFib, EGVNDNEEGFFSAR, SEQ ID NO. 1) en un extremo con el hapteno fluoresceína (FAM) y en el extremo opuesto con biotina para crear el indicador 1 ( $R_1$ ). Debido a que los haptenos, tales como FAM, pueden ser fácilmente capturados por anticuerpos, los presentes inventores probaron primero la capacidad para detectar el indicador por ELISA (**Fig. 15a**). Análogo a un ensayo de sándwich convencional, se recubrió una placa de 96 pocillos con anticuerpos  $\alpha$ -FAM, se dispusieron en capas sobre  $R_1$  para captura por  $\alpha$ -FAM y se completó el complejo de sándwich a través de la adición de estreptavidina-HRP que se une a biotina. Tras el revelado de la placa con el sustrato cromogénico TMB, se detectó la presencia de  $R_1$  en concentraciones sub-pM (**Fig. 15a**), estableciendo la capacidad para construir ensayos de afinidad para indicadores modificados por ligando. Para construir una familia de indicadores ortogonales, se sintetizaron cuatro agentes distintos creando derivados de GluFib modificados en los extremos opuestos con un único hapteno (es decir, FAM, TAMRA, DNP o Alexa488) y biotina ( $R_1$ - $R_4$  marcados, respectivamente; **Fig. 15b**). Para probar la reactividad cruzada, se aplicaron disoluciones enriquecidas con  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  o  $R_4$  a una placa de 96 pocillos recubierta en distintas regiones con anticuerpos  $\alpha$ -FAM,  $\alpha$ -DNP,  $\alpha$ -TAMRA o  $\alpha$ -Alexa488. De acuerdo con sus especificidades, las intensidades de señal más fuertes solo aparecieron en pocillos que contenían pares anticuerpo-hapteno equiparados, mientras que por el contrario las intensidades de señal de combinaciones no equiparadas fueron despreciables (**Fig. 15b,c**). Conjuntamente, estos estudios mostraron que la especificidad de interacciones hapteno-anticuerpo puede ser explotada para construir una familia de indicadores ortogonales.

#### Ejemplo 8: Demostración de la escisión específica *in vivo* usando un ensayo basado en papel.

Se desarrolló un ensayo de flujo lateral basado en papel (EFL) para detectar los indicadores según métodos de la invención. La bioquímica de EFL es similar a la usada en el ensayo de ELISA, por lo que no se requirió cambio en la estructura del indicador. Para el EFL, los anticuerpos se unieron a una membrana de nitrocelulosa en lugar de a una placa de plástico, y se unió la estreptavidina a nanopartículas de oro, que facilitaron la detección óptica de los indicadores (**Fig. 15d**). Primero, se aplicó la muestra, que contenía los indicadores a una almohadilla de celulosa que sirve de depósito para administrar la muestra al resto de la tira. La muestra pasa a través de una "almohadilla conjugada" que contiene nanopartículas de oro (10-100 nm de diámetro) que están recubiertas con estreptavidina. El

resto de biotina sobre los indicadores se unió a la estreptavidina sobre las nanopartículas. Entonces se absorbió la muestra que contenía los conjugados nanopartícula-indicador a la membrana de nitrocelulosa, sobre la que se ha depositado una tira de anticuerpo  $\alpha$ -FAM. El resto de FAM sobre el indicador se une al anticuerpo  $\alpha$ -FAM a medida que la muestra pasó sobre la tira, y los conjugados nanopartícula-indicador se acumularon sobre la tira. Si el indicador está presente en concentración suficiente, las nanopartículas de oro serán visibles a simple vista como una línea roja sobre la membrana de nitrocelulosa. Usando este ensayo se detectó R1 hasta concentraciones de -100 nM en muestras enriquecidas usando el EFL (**Fig. 15e**). Además, los presentes inventores han medido satisfactoriamente múltiples indicadores ortogonales sobre la misma tira reactiva (**Fig. 15f**) usando múltiples tiras que contenían anticuerpos para los diversos haptenos en la biblioteca indicadora. No se observó pérdida de especificidad con respecto al formato de ELISA, que indica que el formato de EFL es igual de eficaz que una herramienta de diagnóstico con el beneficio de estar "libre de trabajo".

Para demostrar la capacidad para detectar la actividad de proteasa en animales vivos por ensayos de afinidad, se conjugaron los sustratos B6 y B7 con indicadores codificados por hapteno con nanopartículas. Tras la administración de nanopartículas, la orina se analizó por ELISA o EFL y se detectó un marcado aumento en la cantidad de indicadores escindidos presentes en las muestras de orina enfermas con respecto a los animales sanos, que ilustran la capacidad de discriminar enfermedad no invasivamente de orina (**Fig. 16a,b**). Por completo, estos estudios demuestran la utilidad de la invención reivindicada y resaltan la capacidad de las composiciones de la invención que se van a usar como 'biomarcadores sintéticos' codificados por ligando que pueden ser fácilmente detectadas por ensayos de afinidad establecidos y de bajo coste.

#### **Ejemplo 9: Nanopartículas sensibles a proteasa para la monitorización de enfermedad urinaria**

Para desarrollar biomarcadores sintéticos para trombosis y cáncer, primero se diseñaron las nanopartículas para detectar la actividad de las proteasas trombina y metaloproteínasa de la matriz 9 (MMP9). Se funcionalizaron nanogusanos (NG) de óxido de hierro recubiertos con poli(etilenglicol) - una formulación de nanopartículas de larga circulación previamente caracterizada por colaboradores y el laboratorio<sup>[28, 29]</sup> con derivados de trombina marcados con fluoresceína- y sustratos escindibles por MMP9 (PLGLRSW, SEQ ID NO: 3, y PLGVRGK, SEQ ID NO: 4, respectivamente<sup>[30]</sup>) en una valencia superficial de 20-30 péptidos por NG para inducir la extinción intermolecular (**Fig. 1A**). Se incubaron NG sensibles a trombina con trombina y se observó un rápido aumento en la fluorescencia de la muestra, ya que los fragmentos de péptido escindidos liberados en disolución fluorescieron libremente para probar la eficiencia de la peptidólisis. No se observó aumento en la fluorescencia en presencia de Argatroban, un inhibidor directo de la trombina, o cuando el sustrato se sintetizó con D-estereoisómeros resistentes a la proteasa, que indica que la actividad de la trombina se requirió para activar los NG. Se observaron aumentos similares en la fluorescencia de la muestra cuando NG sensibles a MMP se incubaron con MMP9 y no se observó actividad cuando se usaron el inhibidor de MMP de amplio espectro Marimastat o sustratos de D-isómero. Juntos estos hallazgos mostraron que los péptidos sobre la superficie de NG pueden ser eficientemente escindidos por trombina o MMP9.

Se sintetizaron los NG con sustratos marcados con fluoróforos de infrarrojos cercano unidos a péptidos portadores para monitorizar el tráfico de péptidos y la escisión por obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo*. Se conjugó el fluoróforo de infrarrojos cercano VT750 (extremo N) con el péptido glutamato-fibrinopéptido B (GluFib, secuencia eGvndneeGffsar, SEQ ID NO: 1), que se sintetizó con D-aminoácidos (minúscula) para conferir estabilidad contra la actividad de proteasa, para promover la eliminación renal y para permitir la visualización fluorescente *in vivo* del indicador de péptido-fluoróforo liberado por la proteólisis del sustrato<sup>[30, 31, 32]</sup>.

Se eligió un modelo murino de trombosis en el que la aparición de coagulación se controla por la administración IV de colágeno y epinefrina para activar plaquetas y trombina, formando coágulos de sangre que embolizan los pulmones<sup>[33]</sup>. De acuerdo con los resultados previos, la coadministración de NG a ratones expuestos a colágeno y epinefrina produjo un pronunciado aumento en su fluorescencia urinaria y de pulmón con respecto a controles sanos, que indica la escisión *in vivo* y la eliminación renal de péptidos. Para aplicar a CRC, se infundieron NG sensibles a MMP9 en ratones sin pelo que llevaban tumores colorrectales humanos subcutáneos (LS174T), formados por una línea celular que secretaba MMP9<sup>[34]</sup>, y se observaron aumentos similares en la fluorescencia limitada a la vejiga. La tinción inmunofluorescente de secciones tumorales confirmó la extravasación de NG de la vasculatura en el intersticio tumoral. Estos resultados verificaron la capacidad de los biomarcadores sintéticos para investigar los sitios de enfermedad y liberar fragmentos de péptido escindidos en la orina del hospedador.

#### **Ejemplo 10: Detección de indicadores codificados por ligando por complejos de sándwich**

Los presentes inventores buscaron a continuación diseñar un panel de indicadores codificados por ligando que se puede detectar por complejos de sándwich basados en proteína. La formación de un complejo de sándwich requiere un antígeno diana para expresar dos epítopes distintos que se unen por separado a un agente de captura y de detección; se conjugaron los ligandos fluoresceína (FAM; captura) y biotina (detección) con los extremos opuestos del mismo D-estereoisómero GluFib para construir el indicador R1 heterobifuncional sintético. GluFib sirve de espaciador molecular, que permite que FAM y biotina se unan libremente a sus proteínas relacionadas el anticuerpo  $\alpha$ -FAM (a-R1) y estreptavidina, respectivamente, y como antes, promueve la eliminación del indicador ya que GluFib es biológicamente inerte y se filtra eficientemente por los riñones<sup>[30, 31, 32]</sup>. Se determinó en primer lugar si muestras de

orina enriquecidas con R1 se podrían detectar por ELISA de sándwich, un ensayo convencional usado en laboratorios clínicos. Se aplicaron diluciones sucesivas de R1 a una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpos a-R1 para inmovilizar R1 antes de que se añadiera neutravidina-peroxidasa de rábano picante (NA-HRP) para catalizar el desarrollo del sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que revela una dependencia de dosis lineal de ~6 pM hasta el límite de detección (LOD) de ~0,1 pM. Esto comparó favorablemente LOD con la sensibilidad en la que los biomarcadores que existen de forma natural tales como antígeno prostático específico<sup>[35]</sup> se pueden detectar por ELISA, estableciendo la capacidad para diseñar ensayos sintéticos de sándwich aprovechando las interacciones ligando-proteína. Se puede encontrar a continuación un análisis de regiones lineales de diferentes indicadores en la Tabla 3.

Tabla 3

| Indicador | Estructura del indicador | Intervalo lineal (pM) | Pendiente               | Ordenada en el origen | R <sup>2</sup> |
|-----------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|
| 1         | FAM-GluFib-Biotina       | 0,08 - 6,25           | 0,01832 +/- 0,001611    | 0,05723 +/- 0,003875  | 0,9486         |
| 2         | DNP-GluFib-Biotina       | 7,35 - 87             | 0,001832 +/- 0,00007243 | 0,06115 +/- 0,002290  | 0,9877         |
| 3         | TMR-GluFib-Biotina       | 54,5 - 700            | 0,001163 +/- 0,00003436 | 0,09762 +/- 0,008225  | 0,9922         |
| 4         | AF488-GluFib-Biotina     | 23 - 200              | 0,001259 +/- 0,00003604 | 0,07760 +/- 0,002649  | 0,9911         |

Para generalizar el enfoque y la construcción de una biblioteca multiplexada de indicadores, se sintetizaron derivados heterobifuncionales adicionales de GluFib emparejando los ligandos de captura dinitrofenilo (DNP), tetrametilrodamina (TMR) y Alexa Fluor 488 (AF488) con biotina para crear indicadores R2-R4, respectivamente. Similar a la fluoresceína, estos ligandos se seleccionaron debido a que son bien tolerados por organismos vivos, estables y no provocan respuestas inmunitarias a menos que se acoplen con un potente inmunogén<sup>[36]</sup>. Se desarrollaron ELISA de sándwich independientes usando los anticuerpos  $\alpha$ -DNP ( $\alpha$ -R2),  $\alpha$ -TMR ( $\alpha$ -R3) o  $\alpha$ -AF488 ( $\alpha$ -R4) para capturar R2, R3 o R4, respectivamente, y se identificó el LOD y los intervalos lineales de trabajo para cada uno, que también estuvieron dentro de los valores típicos esperados para ELISA de sándwich. El ensayo de especificidad reveló un aumento en la intensidad de muestras en pocillos que contenían pares anticuerpo-ligando equiparados mientras que la reactividad cruzada en pocillos no equiparados fue inferior al LOD de la señal de detección relacionada. Los resultados mostraron que los indicadores codificados por ligando pueden ser sensiblemente y específicamente detectados en orina por ELISA de sándwich.

#### Ejemplo 11: Detección de la de proteasa de actividad y desarrollo del ensayo de papel

Los EFL basados en papel, desarrollados hace más de dos décadas para detectar gonadotropina coriónica humana como prueba de embarazo en casa, se han extendido desde entonces para su uso en diversos ámbitos para detectar patógenos, fármacos, hormonas y metabolitos<sup>[37]</sup>. Los EFL detectan antígenos por un complejo de sándwich en el que los anticuerpos de captura se adsorben sobre una tira reactiva altamente porosa, tal como una membrana de nitrocelulosa, que sirve para hacer subir fluidos y transportar analitos desde la almohadilla de muestra hasta las regiones de captura. Entonces se visualizan los analitos inmovilizados por un agente de detección acoplado a nanopartículas (normalmente nanoesferas de oro o de látex) que crean una línea coloreada detectable a simple vista sin amplificación enzimática.

Aquí, los presentes inventores buscaron determinar si indicadores codificados por ligando se podrían detectar sobre papel. Usando un manipulador de líquidos robótico de bajo volumen, se depositaron anticuerpos a-R1 y a-estreptavidina para crear líneas de prueba y de control, respectivamente, sobre tiras de papel de nitrocelulosa. Se aplicaron muestras de orina de ratón sin procesar enriquecidas con R1, luego a las almohadillas de muestra seguido por una disolución que contenía estreptavidina conjugada con nanopartículas de oro. Aparecieron líneas coloreadas donde se imprimieron los anticuerpos de prueba, que indica la captura de R1 de orina y la detección como un complejo de sándwich. Los barridos cuantitativos de EFL usados para analizar diluciones sucesivas de R1 revelaron un LOD de ~1 nM y un intervalo lineal de trabajo de ~1-7 nM. Se observó una métrica de rendimiento similar para EFL separados personalizados para los restantes indicadores. Las estadísticas para regiones lineales de las curvas patrón de R1-4 se pueden encontrar en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

| Indicador | Estructura del indicador | Intervalo lineal (pM) | Pendiente               | Ordenada en el origen | R <sup>2</sup> |
|-----------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|
| 1         | FAM-Glu Fib-Biotina      | 0,09 - 6,25           | 0,01832 +/- 0,001611    | 0,05723 +/- 0,003875  | 0,9486         |
| 2         | DNP-GluFib-Biotina       | 7,35 - 87             | 0,001832 +/- 0,00007243 | 0,06115 +/- 0,002290  | 0,9877         |
| 3         | TMR-GluFib-Biotina       | 54,5 - 700            | 0,001163 +/- 0,00003436 | 0,09762 +/- 0,008225  | 0,9922         |
| 4         | AF488-GluFib-Biotina     | 23 - 200              | 0,001259 +/- 0,00003604 | 0,07760 +/- 0,002649  | 0,9911         |

Se imprimieron anticuerpos de captura en cuatro líneas de prueba paralelas con respecto a una línea de control y se analizaron muestras de orina que contenían uno de los cuatro indicadores para permitir la detección multiplexada de indicadores. Solo las líneas de prueba impresas con el anticuerpo de captura relacionado revelaron una señal positiva, resaltando la especificidad de EFL y la capacidad para detectar distintos indicadores con tiras de papel individuales espacialmente codificadas, similares a los resultados de las pruebas de ELISA.

Se conjugaron con R3 en tándem sustratos sensibles a la trombina sobre NG para detectar la actividad de proteasa por EFL. Tras la escisión del sustrato *in vitro* por trombina, los fragmentos de péptido se recogieron por filtración por exclusión de tamaño. Se detectó fácilmente R3 escindido del filtrado por EFL, revelándose en líneas de prueba significativamente más oscuras cuando se comparó con muestras de control no expuestas a trombina ( $p=0,0022$ ). Se obtuvieron resultados similares cuando el filtrado se recogió después de que la incubación de NG sensibles a MMP codificado por R2 con MMP9 se analizara por EFL ( $p=0,0022$ ). Estos resultados demostraron que la actividad de distintas proteasas se puede detectar por EFL basada en papel.

#### Ejemplo 12: Detección de enfermedad sobre papel con biomarcadores urinarios sintéticos

La concentración de orina depende de muchos factores del hospedador y ambientales (por ejemplo, dieta, nivel de actividad, antecedentes médicos, ritmo circadiano); por tanto, los presentes inventores buscaron desarrollar una estrategia de normalización para la prueba. Se planteó la hipótesis de que los indicadores libres coadministrados pasarían a la orina independientemente del estado de enfermedad y se podrían usar para normalizar el nivel de indicadores liberados por actividad de proteasa. Se infundieron una mezcla de R4 libre y NG sensibles a la trombina (marcados con R3) en cohortes sanas o trombóticas de ratones y se recogió toda la orina durante 30 m después de la inyección para investigar este enfoque. Las concentraciones urinarias de R4 fueron estadísticamente independientes entre los dos grupos por ELISA, que indica la eliminación no sesgada del indicador libre ( $p=0,25$ ). Por el contrario, los niveles urinarios de R3, el indicador de la actividad de la trombina, aumentaron significativamente en ratones que alojaban trombos cuando se cuantificaron independientemente ( $p<10^{-4}$ ) o cuando se normalizaron contra R4 ( $p<10^{-4}$ ). Usando una tira de papel impresa con múltiples anticuerpos de captura, se analizaron simultáneamente los niveles unitarios de R3 y R4 y se observó similarmente un aumento estadísticamente significativo en la relación de R3/R4 en muestras de orina enfermas en comparación con controles sanos ( $p=0,0015$ ). Se analizó la tasa de positivos verdaderos (sensibilidad) y positivos falsos (1-especificidad) por las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) y se encontró que la prueba multiplexada del papel discriminó con exactitud orina de ratones trombóticos frente a de control, con un área bajo la curva (a.b.c) de 0,92 ( $p=0,0015$ ).

Se adoptó la estrategia de normalización desarrollada para la trombosis infundiendo una disolución que contenía nanopartículas sensibles a MMP codificadas por R4 y R2 libre en ratones sin pelo que llevaban tumores colorrectales LS174T subcutáneos y recogiendo toda la orina hasta 1 hora después de la inyección para establecer la capacidad para detectar cánceres sólidos. Los ratones enfermos eliminaron R4 con una eficiencia estadísticamente equivalente a los animales sanos ( $p=0,92$ ), mientras que las concentraciones urinarias de R2, el indicador de la actividad de MMP *in vivo*, o su intensidad normalizada (R2/R4) fueron ambos significativamente elevados en orina de ratones portadores de tumores por ELISA ( $p=0,0039$ ,  $p=0,0098$ ). Por análisis de ROC, esta prueba de orina fue altamente precisa y discriminó CRC con un a.b.c de 0,90 ( $p=0,0025$ ). El análisis de las mismas muestras de orina por EFL demostró un aumento significativo en la relación de R2/R4 en la orina recogida de portadores de tumor, pero no de ratones de control ( $p=0,002$ ). Estos resultados mostraron que EFL pueden ambos detectar biomarcadores sintéticos directamente de la orina y discriminar enfermedades no contagiosas con potencia predictiva significativa.

#### Referencias

- [1] a) T. Pisitkun, R. Johnstone, M. A. Knepper, *Molecular & Cellular Proteomics* 2006, 5, 1760; b) J. Barratt, P. Topham, *Canadian Medical Association Journal* 2007, 177, 361; c) J. Adachi, C. Kumar, Y. Zhang, J. V. Olsen, M. Mann, *Genome Biol* 2006, 7, R80.
- [2] a) L. Wide, C. A. Gemzell, *Acta Endocrinologica* 1960, XXXV, 261; b) L. A. Cole, A. Kardana, D. B. Seifer, H. C. Bohler, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1994, 78, 497.
- [3] a) Y. Hinokio, S. Suzuki, M. Hirai, M. Chiba, A. Hirai, T. Toyota, *Diabetologia* 1999, 42, 995; b) T. Nishikawa, T. Sasahara, S. Kiritoshi, K. Sonoda, T. Senokuchi, T. Matsuo, D. Kukidome, N. Wake, T. Matsumura, N. Miyamura, M. Sakakida, H. Kishikawa, E. Araki, *Diabetes Care* 2003, 26, 1507; c) L. L. Wu, C. C. Chiou, P. Y. Chang, J. T. Wu, *Clinica Chimica Acta* 2004, 339, 1; d) K. Rossing, H. Mischak, M. Dakna, P. Zúrbig, J. Novak, B. A. Julian, D. M. Good, J. J. Coon, L. Tarnow, P. Rossing, o. b. o. t. P. Network, *Journal of the American Society of Nephrology* 2008, 19, 1283.
- [4] a) G. H. Tesch, *Nephrology* 2010, 15, 609; b) R. G. Fassett, S. K. Venuthurupalli, G. C. Gobe, J. S. Coombes, M. A. Cooper, W. E. Hoy, *Kidney Int* 2011, 80, 806; c) J. Mishra, Q. Ma, A. Prada, M. Mitsnefes, K. Zahedi, J. Yang, J. Barasch, P. Devarajan, *Journal of the American Society of Nephrology* 2003, 14, 2534.
- [5] a) M. A. Moses, D. Wiederschain, K. R. Loughlin, D. Zurakowski, C. C. Lamb, M. R. Freeman, *Cancer Research* 1998, 58, 1395; b) R. Roy, J. Yang, M. A. Moses, *Journal of Clinical Oncology* 2009, 27, 5287.
- [6] G. A. Kwong, G. von Maltzahn, G. Murugappan, O. Abudayyeh, S. Mo, I. A. Papayannopoulos, D. Y. Sverdllov, S. B. Liu, A. D. Warren, Y. Popov, D. Schuppan, S. N. Bhatia, *Nature Biotechnology* 2013, 31, 63.
- [7] S. L. Robbins, V. Kumar, R. S. Cotran, *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, 2010.
- [8] a) E. W. Davie, J. D. Kulman, *Semin Thromb Hemost* 2006, 32, 003; b) J. A. Huntington, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005, 3, 1861.
- [9] a) F. A. Jaffer, C.-H. Tung, R. E. Gerszten, R. Weissleder, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002, 22, 1929; b) C.-H. Tung, R. E. Gerszten, F. A. Jaffer, R. Weissleder, *ChemBioChem* 2002, 3, 207; c) E. S.

- Olson, M. A. Whitney, B. Friedman, T. A. Aguilera, J. L. Crisp, F. M. Baik, T. Jiang, S. M. Baird, S. Tsimikas, R. Y. Tsien, Q. T. Nguyen, *Integrative Biology* 2012, 4, 595.
- [10] M. Whitney, E. N. Savariar, B. Friedman, R. A. Levin, J. L. Crisp, H. L. Glasgow, R. Lefkowitz, S. R. Adams, P. Steinbach, N. Nashi, Q. T. Nguyen, R. Y. Tsien, *Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52, 325.
- 5 [11] a) H. Bounameaux, P. de Moerloose, A. Perrier, G. Reber, *Thromb Haemost* 1994, 71, 1; b) J. S. Ginsberg, P. S. Wells, C. Kearon, D. Anderson, M. Crowther, J. I. Weitz, J. Bormanis, P. Brill-Edwards, A. G. Turpie, B. MacKinnon, M. Gent, J. Hirsh, *Annals of Internal Medicine* 1998, 129, 1006; c) R. Becker, F. Spencer, *J Thromb Thrombolysis* 1998, 5, 215.
- 10 [12] J.-H. Park, G. von Maltzahn, L. Zhang, A. M. Derfus, D. Simberg, T. J. Harris, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, M. J. Sailor, *Small* 2009, 5, 694.
- [13] a) G. A. Mitchell, R. J. Gargiulo, R. M. Huseby, D. E. Lawson, S. P. Pochron, J. A. Sehuanes, *Thrombosis Research* 1978, 13, 47; b) K. Asai, M. Asai, *Clin Chim Acta* 1984, 144, 163; c) M. L. Larsen, U. Abildgaard, A. N. Teien, K. Gjesdal, *Thrombosis Research* 1978, 13, 285; d) D. S. Rijkers, S. J. H. Wielders, G. I. Tesser, H. C. Hemker, *Thrombosis Research* 1995, 79, 491.
- 15 [14] T. A. Morris, J. J. Marsh, C. M. Burrows, P. G. Chiles, R. G. Konopka, C. A. Pedersen, *Thrombosis Research* 2003, 110, 159.
- [15] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chemical Reviews* 2005, 105, 1547.
- [16] a) E. J. Weiss, J. R. Hamilton, K. E. Lease, S. R. Coughlin, *Blood* 2002, 100, 3240; b) N. Lenain, M. Freund, C. Leon, J. P. Cazenave, C. Gachet, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003, 1, 1144; c) S. S. Smyth, E. D. Reis, H. Väänänen, W. Zhang, B. S. Coller, *Blood* 2001, 98, 1055.
- 20 [17] N. Mackman, *Nature* 2008, 451, 914.
- [18] S. P. Jackson, *Nat Med* 2011, 17, 1423.
- [19] a) G. DiMinno, M. J. Silver, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1983, 225, 57; b) A. Angelillo-Scherrer, P. G. de Frutos, C. Aparicio, E. Melis, P. Savi, F. Lupu, J. Arnout, M. Dewersch, M. F. Hoylaerts, J.-M. Herbert, D. Collen, B. Dahlback, P. Carmeliet, *Nat Med* 2001, 7, 215; c) A. D. Warren, G. A. Kwong, D. K. Wood, S. N. Bhatia, Manuscript in preparation.
- 25 [20] B. M. Koeppen, B. A. Stanton, *Renal physiology*, Mosby Elsevier, Philadelphia, 2007.
- [21] a) P. Vestergaard, R. Leverett, *J Lab Clin Med* 1958, 51, 211; b) M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, *Physiol Rev* 2000, 80, 1107.
- 30 [22] a) J. H. Roe, J. H. Epstein, N. P. Goldstein, *Journal of Biological Chemistry* 1949, 178, 839; b) F. Gaspari, N. Perico, G. Remuzzi, *Kidney Int Suppl* 1997, 63, S151; c) Z. Qi, I. Whitt, A. Mehta, J. Jin, M. Zhao, R. C. Harris, A. B. Fogo, M. D. Breyer, *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2004, 286, F590.
- [23] a) J. E. Ghadiali, M. M. Stevens, *Advanced Materials* 2008, 20, 4359; b) K. Welsler, R. Adsley, B. M. Moore, W. C. Chan, J. W. Aylott, *Analyst* 2011, 136, 29; c) R. de la Rica, D. Aili, M. M. Stevens, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, 64, 967.
- 35 [24] a) P. Yager, G. J. Domingo, J. Gerdes, *Annu Rev Biomed Eng* 2008, 10, 107; b) A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, E. Carrilho, *Analytical Chemistry* 2009, 82, 3.
- [25] B. J. Backes, J. L. Harris, F. Leonetti, C. S. Craik, J. A. Ellman, *Nat Biotechnol* 2000, 18, 187.
- 40 [26] a) R. M. Botnar, A. S. Perez, S. Witte, A. J. Wiethoff, J. Laredo, J. Hamilton, W. Quist, E. C. Parsons, A. Vaidya, A. Kolodziej, J. A. Barrett, P. B. Graham, R. M. Weisskoff, W. J. Manning, M. T. Johnstone, *Circulation* 2004, 109, 2023; b) D. Simberg, T. Duza, J. H. Park, M. Essler, J. Pilch, L. Zhang, A. M. Derfus, M. Yang, R. M. Hoffman, S. Bhatia, M. J. Sailor, E. Ruoslahti, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, 104, 932; c) T. Hara, B. Bhayana, B. Thompson, C. W. Kessinger, A. Khatri, J. R. McCarthy, R. Weissleder, C. P. Lin, G. J. Tearney, F. A. Jaffer, *JACC Cardiovasc Imaging* 2012, 5, 607.
- 45 [27] a) J. Hirsh, A. Y. Y. Lee, *Blood* 2002, 99, 3102; b) B. R. Robinson, A. K. Hough, G. L. Reed, *Circulation* 2000, 102, 1151.
- [28] Park J-H et al. (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging. *Adv Mater* 20:1630-1635.
- 50 [29] Park J-H et al. (2009) Systematic Surface Engineering of Magnetic Nanoworms for In vivo Tumor Targeting. *Small* 5:694-700.
- [30] Kwong GA et al. (2013) Mass-encoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease. *Nature Biotechnology* 31:63-70.
- [31] Lin KY, Kwong GA, Warren AD, Wood DK, Bhatia SN (2013) Nanoparticles that sense thrombin activity as synthetic urinary biomarkers of thrombosis. *ACS Nano* 7:9001-9009.
- 55 [32] Morris TA et al. (2003) Urine and plasma levels of fibrinopeptide B in patients with deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Thrombosis Research* 110:159-165.
- [33] Smyth SS, Reis ED, Vaananen H, Zhang W, Coller BS (2001) Variable protection of beta3-integrin-deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood* 98:1055-1062.
- [34] Brand K et al. (2000) Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. *Cancer Research* 60:5723-5730.
- 60 [35] Giljohann DA, Mirkin CA (2009) Drivers of biodiagnostic development. *Nature* 462:461-464.
- [36] Hermanson GT (2008) *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, New York). 2nd Ed.
- [37] Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Amerongen A (2008) Lateral flow (immuno)assay: its strengths weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393:569-582.
- 65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Massachusetts Institute of Technology  
 Bhatia, Sangeeta  
 Wood, David K.  
 5 Kwong, Gabriel A.  
 Warren, Andrew D.  
 Lin, Kevin Y.

10 <120> DETECCIÓN BASADA EN AFINIDAD DE BIOMARCADORES SINTÉTICOS CODIFICADOS POR LIGANDOS  
 <130> M0656.70304WO00

15 <140> Aún no está asignada  
 <141> Simultáneamente con la presente  
 <150> US 61/832,766  
 <151> 07-06-2013

20 <160> 4  
 <170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-isómero

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(8)  
 <223> D-isómero

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(14)  
 <223> D-isómero

<400> 1

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Glu | Gly | Val | Asn | Asp | Asn | Glu | Glu | Gly | Phe | Phe | Ser | Ala | Arg |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |

50 <210> 2  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-isómero

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(8)  
 <223> D-isómero

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(14)  
 <223> D-isómero

10

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Modificado con Flsc

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> D-isómero

20

<400> 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gly | Val | Asn | Asp | Asn | Glu | Glu | Gly | Phe | Phe | Ser | Ala | Arg | Lys | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Phe | Pro | Arg | Ser | Gly | Gly | Gly | Cys |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |

<210> 3  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

30

<400> 3

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Gly | Leu | Arg | Ser | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |

35

<210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 4

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Gly | Val | Arg | Gly | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |

45

## REIVINDICACIONES

## 1. Un método, que comprende:

recoger una muestra de orina de un sujeto, que se sospecha que tiene un trastorno o una afección, en donde al sujeto se le ha administrado una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular, que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable con lo que el marcador detectable se libera de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una proteasa, en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección, conectados por glutamato-fibrinopéptido B (GluFib) [SEQ ID NO: 1], y en donde el ligando de captura se selecciona del grupo que consiste en fluoresceína, dinitrofenilo, tetra-metilrodamina y Alexa Fluor 488 y el ligando de detección es biotina; y someter la muestra de orina a un método de análisis por un ensayo de captura, en donde el ensayo de captura implica una etapa de afinidad, uniéndose un agente de afinidad al ligando de captura y a una etapa de detección, detectándose el ligando de detección para detectar la presencia del marcador de ligando, y siendo la presencia del marcador de ligando en la muestra biológica indicativa del trastorno o de la afección dentro del sujeto.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de detección se selecciona del grupo que consiste en un ensayo de ELISA y en un ensayo de flujo lateral.

3. El método de la reivindicación 1, en el que al sujeto se le administra una pluralidad de nanopartículas de biomarcador, que tienen una pluralidad de marcadores detectables susceptibles a enzimas.

4. El método de la reivindicación 1, que comprende además administrar un agente terapéutico al sujeto para tratar el trastorno o la afección.

## 5. Un reactivo, que comprende:

una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular, que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable, con lo que el marcador detectable se libera de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una proteasa, en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por glutamato-fibrinopéptido B (GluFib) [SEQ ID NO: 1], y en donde el ligando de captura se selecciona del grupo que consiste en fluoresceína, dinitrofenilo, tetra-metilrodamina y Alexa Fluor 488 y el ligando de detección es biotina.

6. El reactivo de la reivindicación 5, en el que el ligando de captura se une al dominio susceptible a enzimas.

7. El reactivo de la reivindicación 5, en el que el ligando de detección se une al dominio susceptible a enzimas.

8. El reactivo de la reivindicación 5, en el que la nanopartícula de biomarcador tiene una pluralidad de marcadores detectables susceptibles a enzimas.

## 9. Una composición, que comprende:

una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular, que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, que es liberado de la nanopartícula de biomarcador, cuando se expone a una proteasa y a un indicador libre, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas unido a un marcador detectable, en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectado por glutamato-fibrinopéptido B (GluFib) [SEQ ID NO: 1], y en donde el ligando de captura se selecciona del grupo que consiste en fluoresceína, dinitrofenilo, tetra-metilrodamina y Alexa Fluor 488, y el ligando de detección es biotina.

10. La composición de la reivindicación 9, en la que el indicador libre es una proteína, un péptido o un polisacárido.

## 11. Un kit, que comprende:

un recipiente, que aloja una nanopartícula de biomarcador, en donde la nanopartícula de biomarcador comprende una estructura modular, que tiene un dominio de vehículo unido a un marcador detectable susceptible a enzimas, en donde el marcador detectable susceptible a enzimas comprende un dominio susceptible a enzimas, unido a un marcador detectable, con lo que el marcador detectable se libera de la nanopartícula de biomarcador cuando se expone a una proteasa, en donde el marcador detectable comprende un ligando de captura y un ligando de detección conectados por glutamato-fibrinopéptido B (GluFib) [SEQ ID NO: 1], y en donde el ligando de captura se selecciona del grupo que consiste en fluoresceína, dinitrofenilo, tetra-metilrodamina y Alexa Fluor 488 y el ligando de detección es biotina; e instrucciones para administrar la nanopartícula a un sujeto y para analizar una muestra biológica del sujeto para detectar la presencia del marcador de ligando generado por la administración de la nanopartícula por un ensayo de captura.

12. El kit de la reivindicación 11, que comprende además un recipiente que aloja un agente de afinidad que se une al ligando de captura.
- 5 13. El kit de la reivindicación 11, que comprende además un recipiente que aloja un reactivo de detección que se une al ligando de detección.
14. El kit de la reivindicación 11, que comprende además un recipiente que aloja un indicador libre.
- 10 15. El kit de la reivindicación 13, en el que el reactivo de detección es un reactivo para un ensayo seleccionado del grupo, que consiste en un ensayo de ELISA y en un ensayo de flujo lateral.
16. El método, el reactivo, la composición o el kit de cualquier reivindicación anterior, en donde la proteasa es trombina o metaloproteasa 9 de matriz (MMP9).

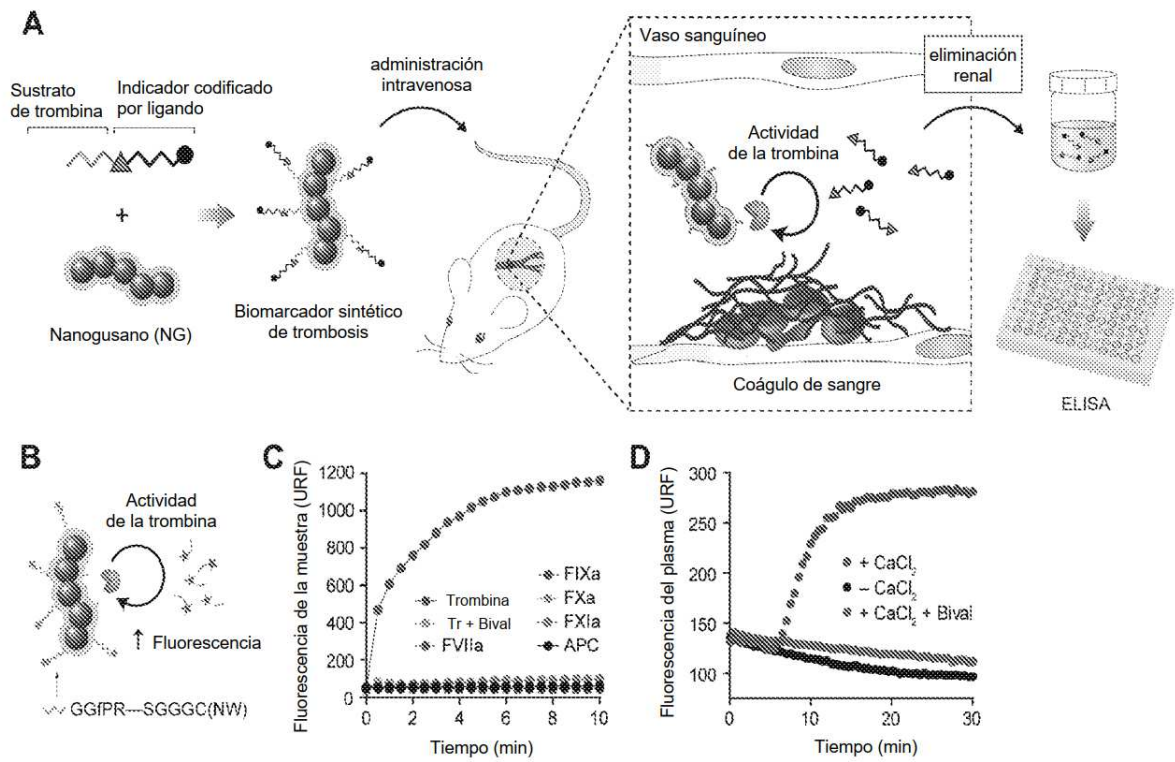


Figura 1

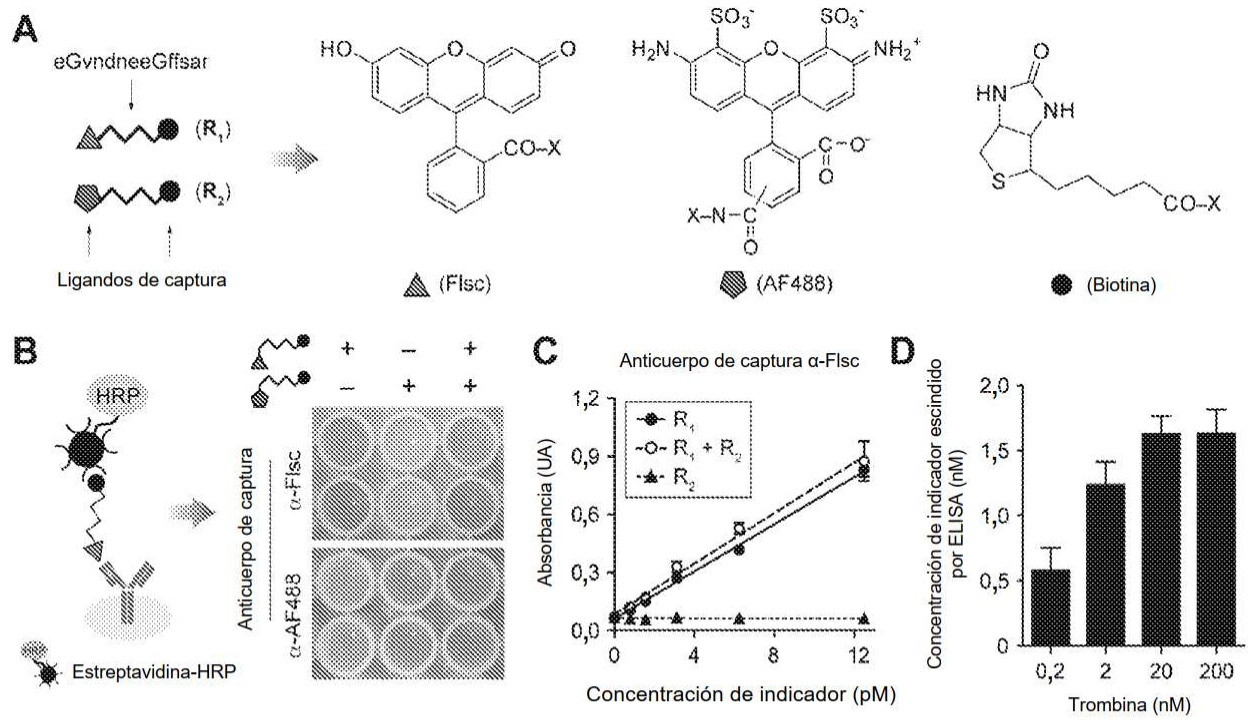


Figura 2

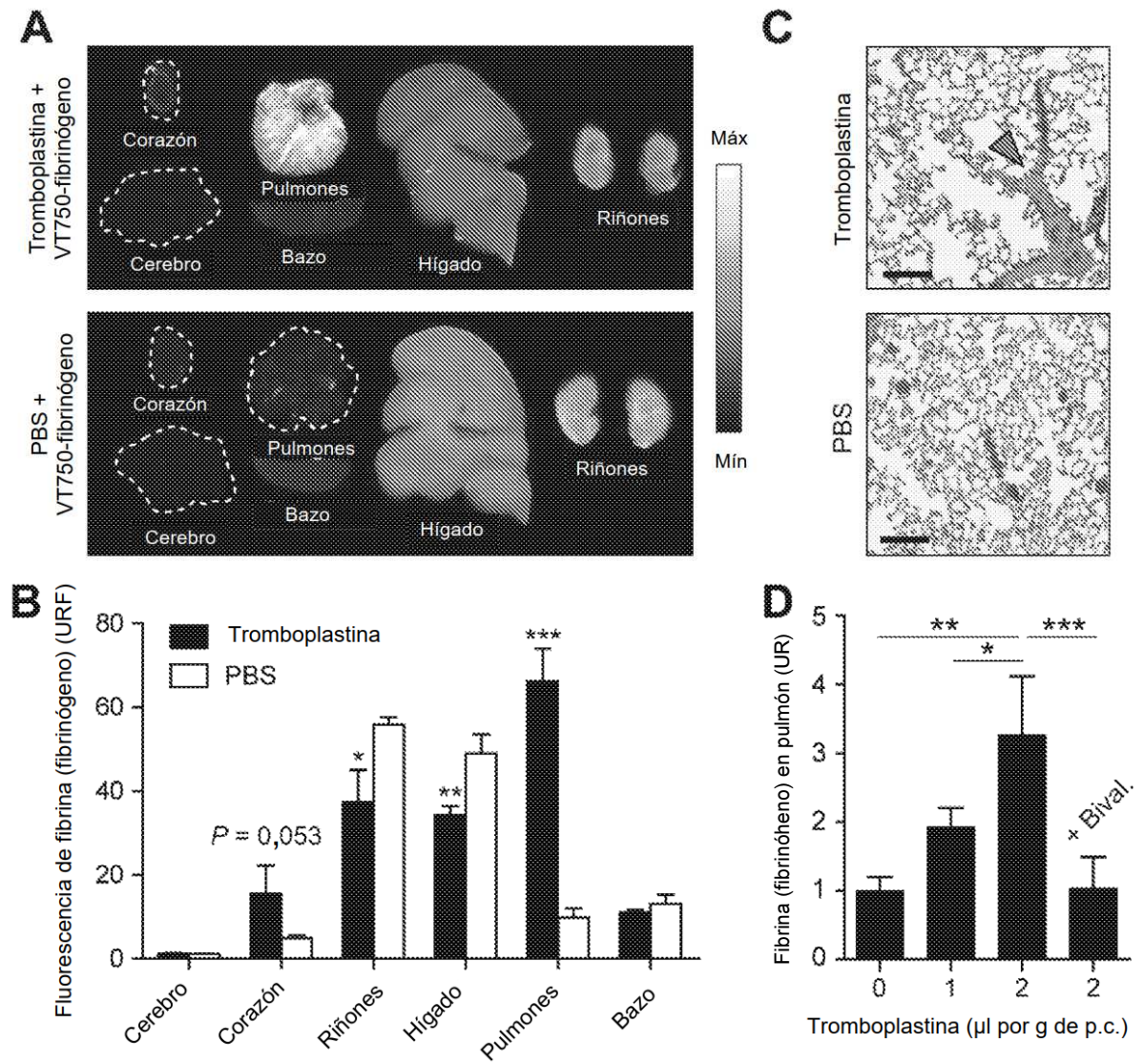


Figura 3

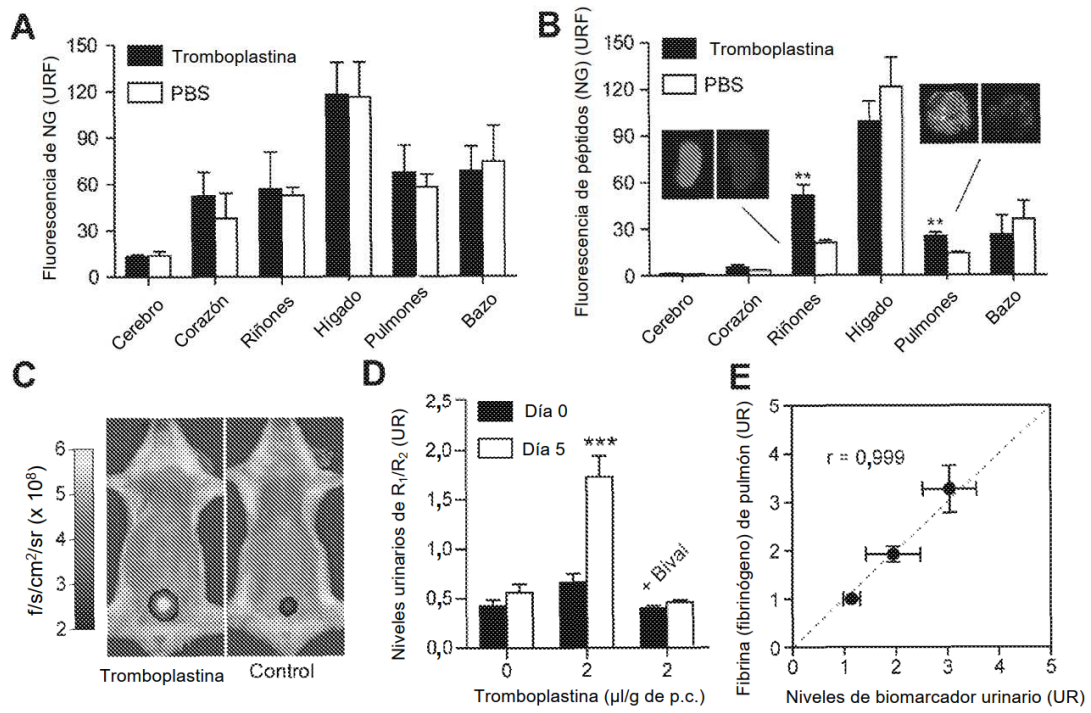


Figura 4

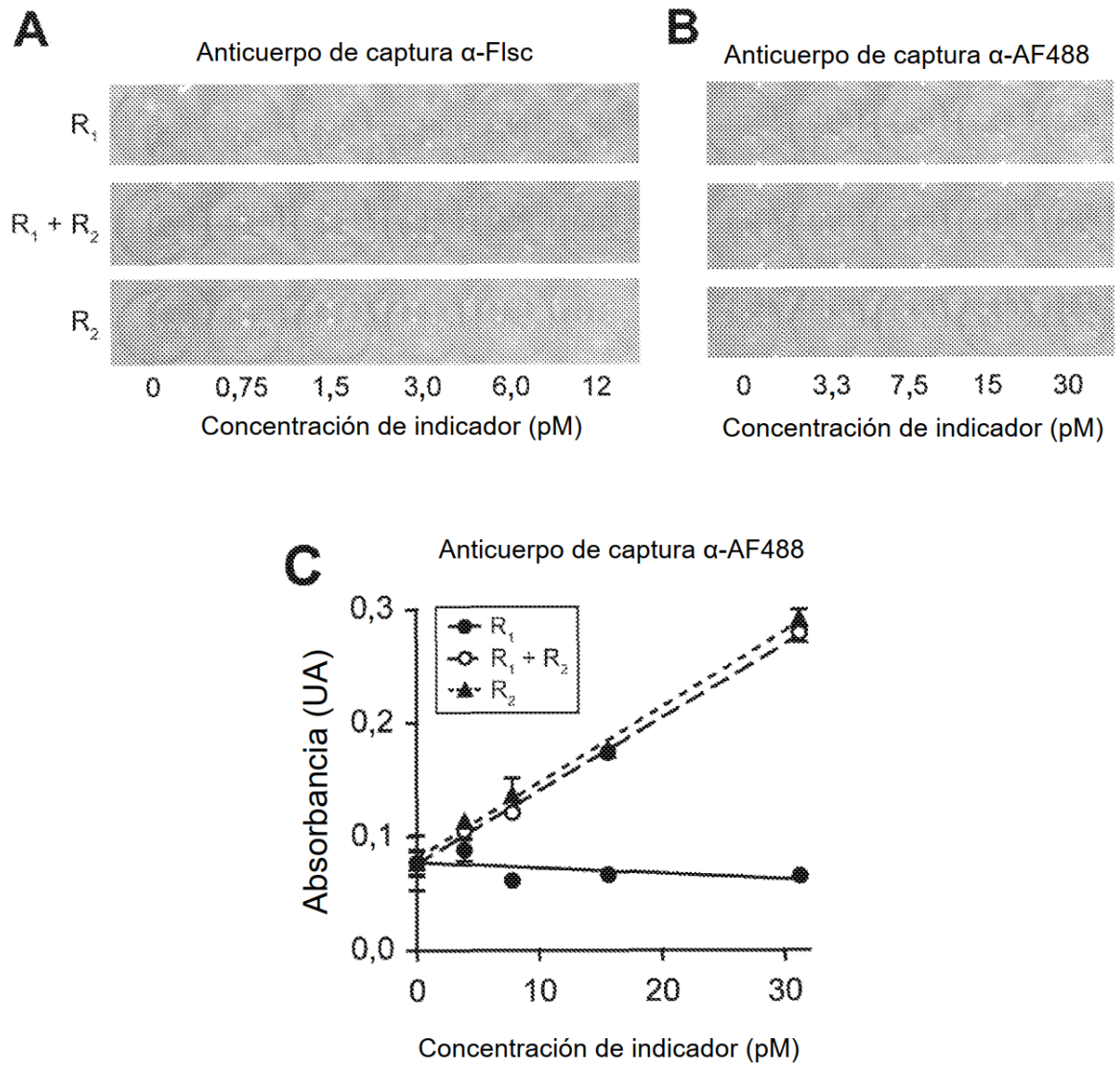


**Figura 5**

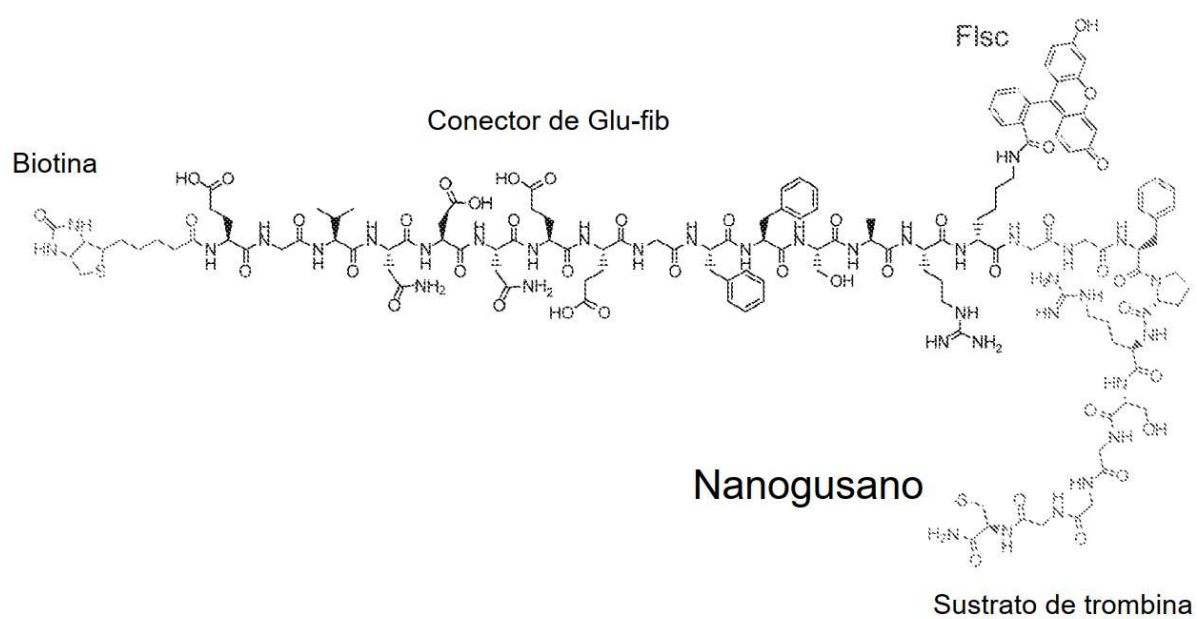


**Figura 6**

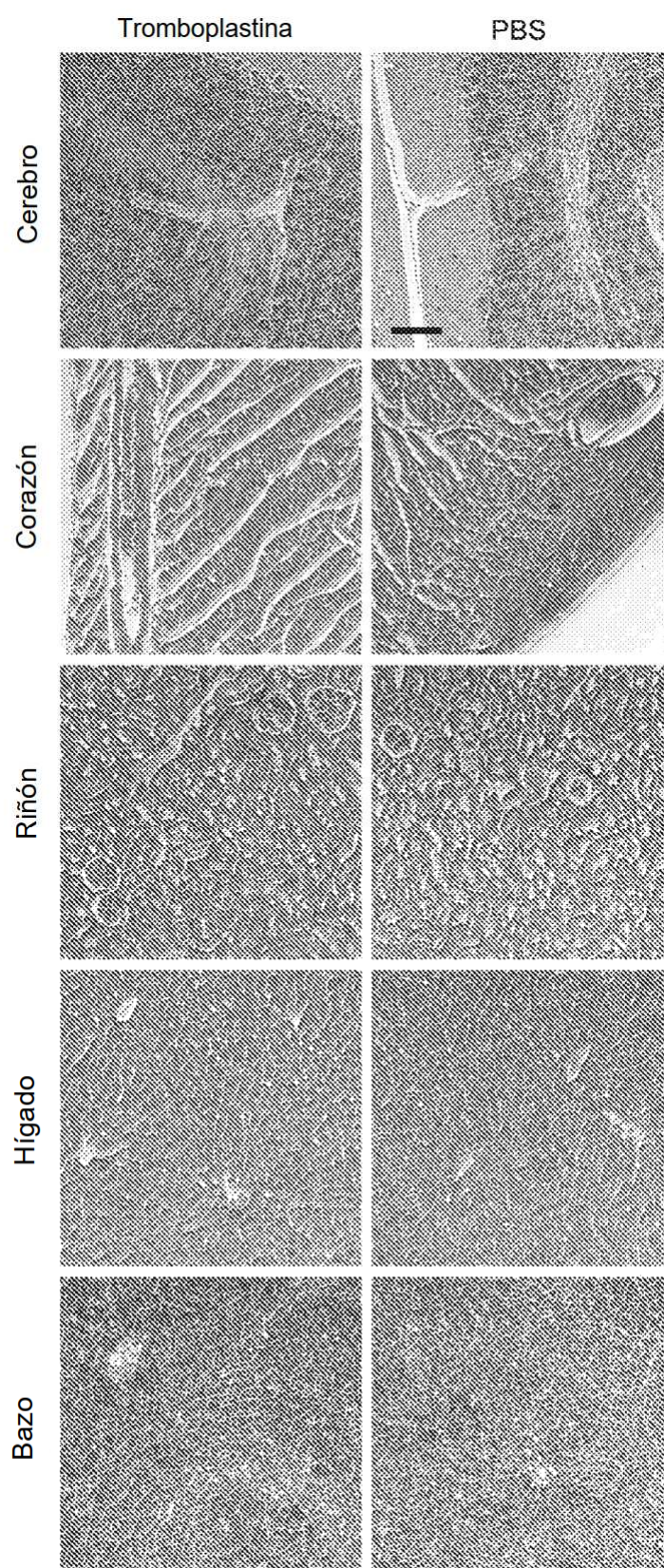


**Figura 7**

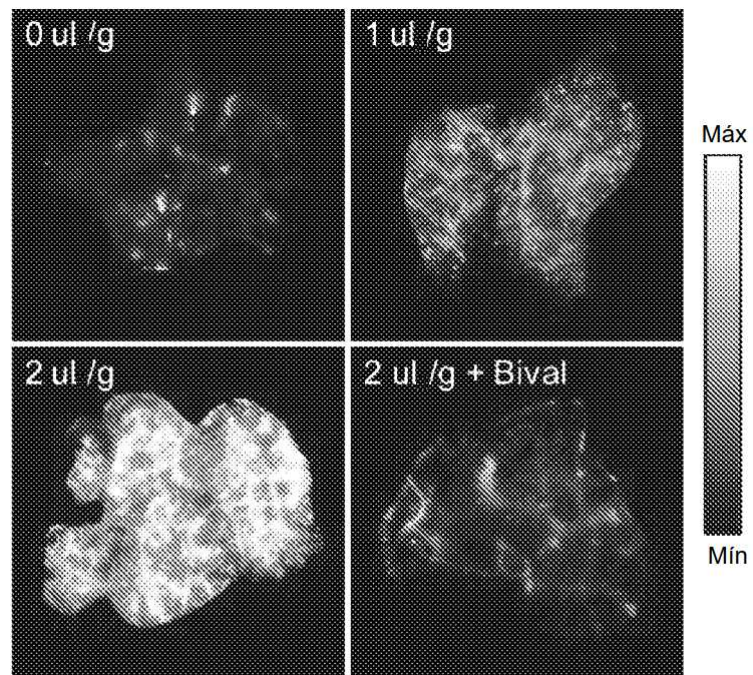


**Figura 8**

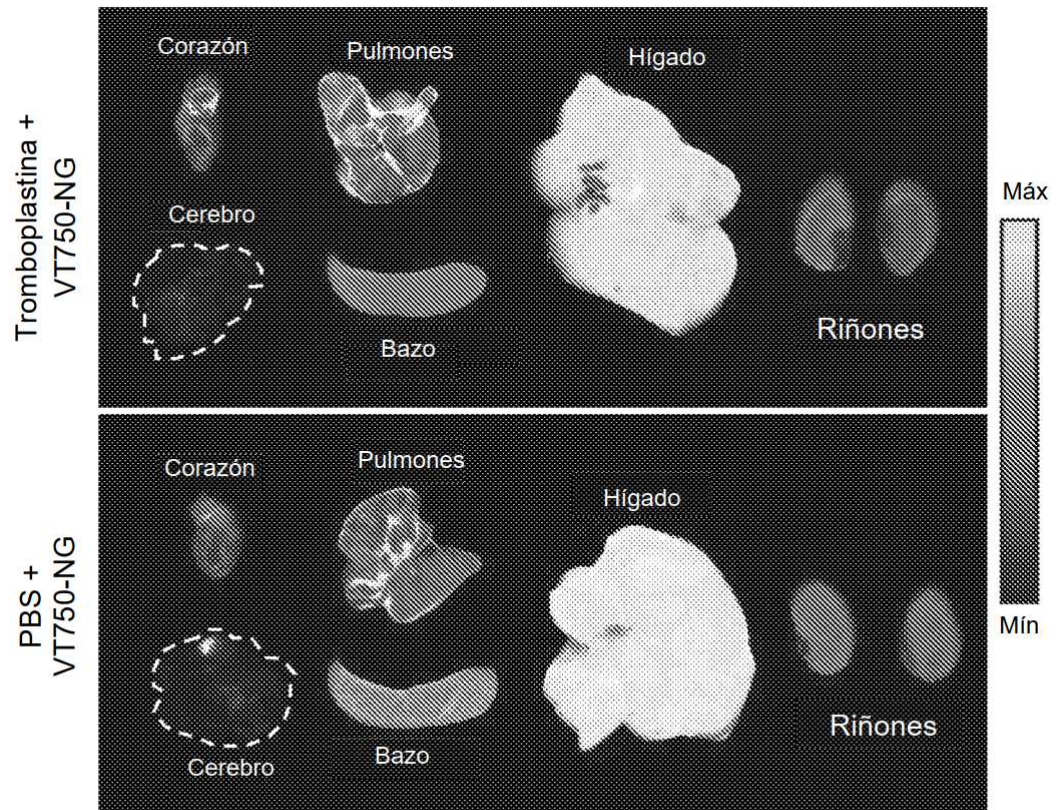


**Figura 9**

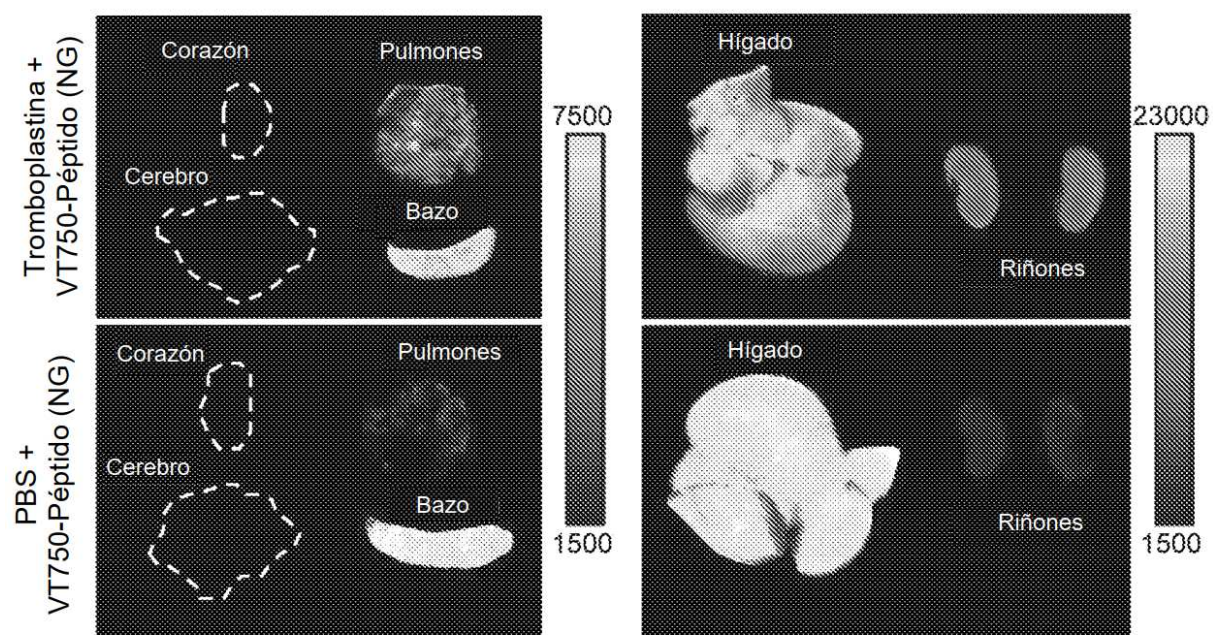


Figura 10

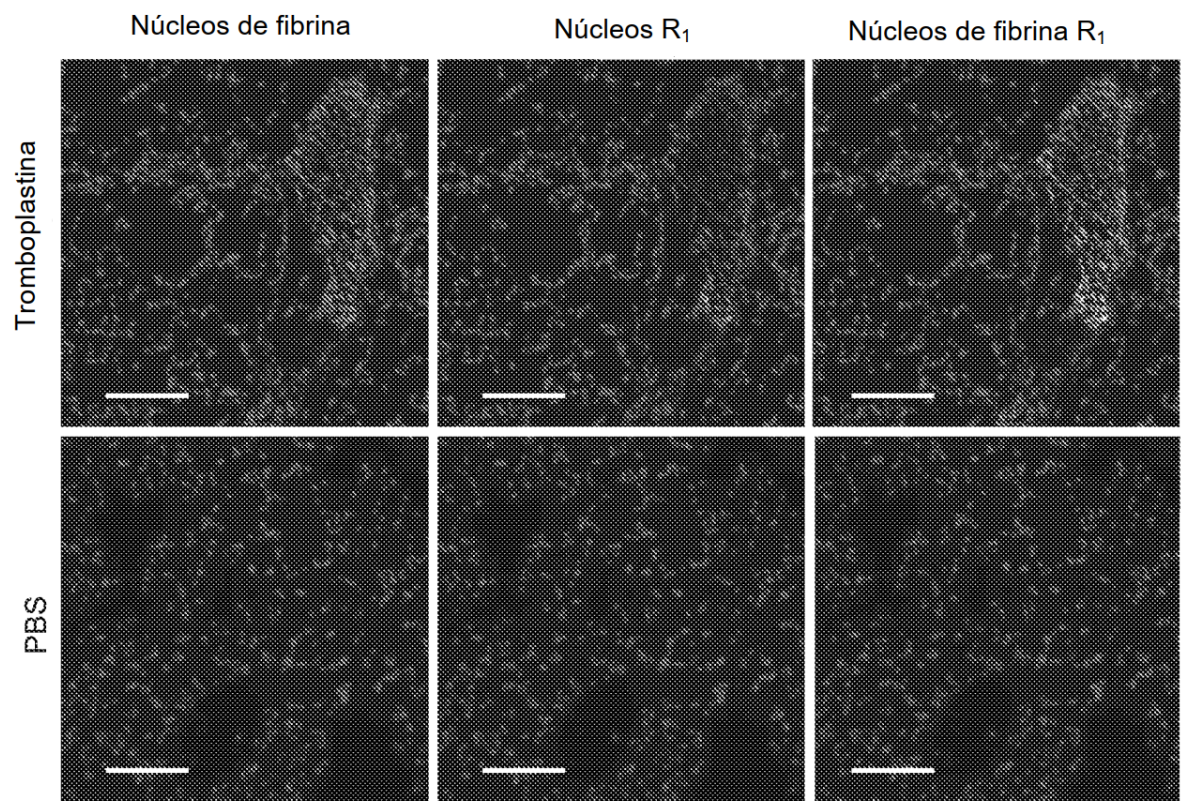


**Figura 11**

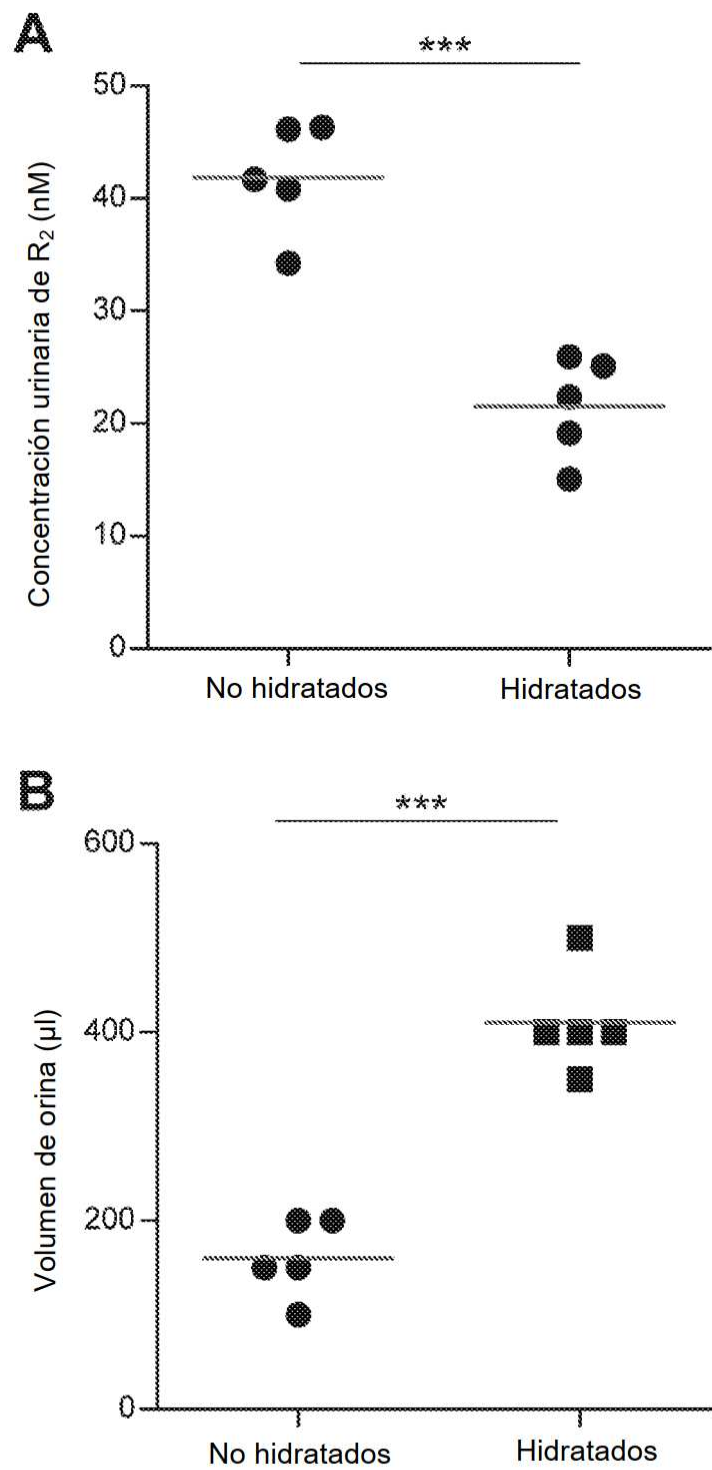


**Figura 12**

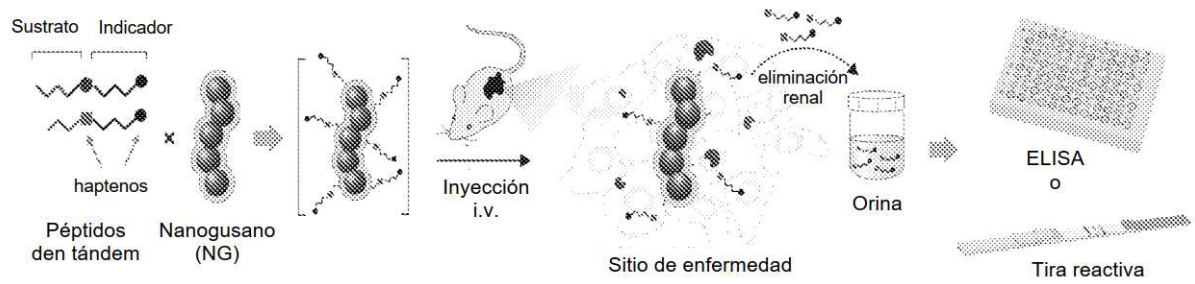


Figura 13

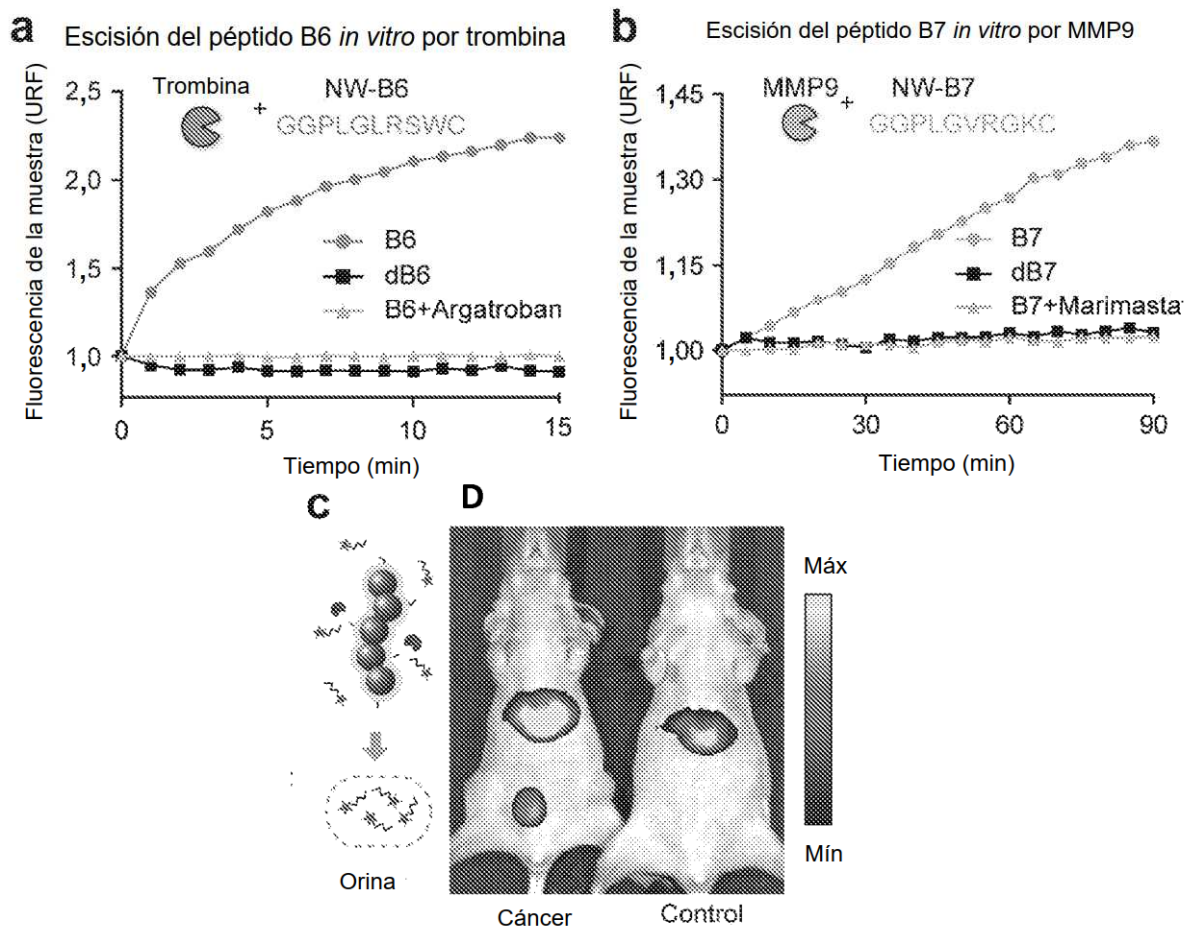


Figura 14

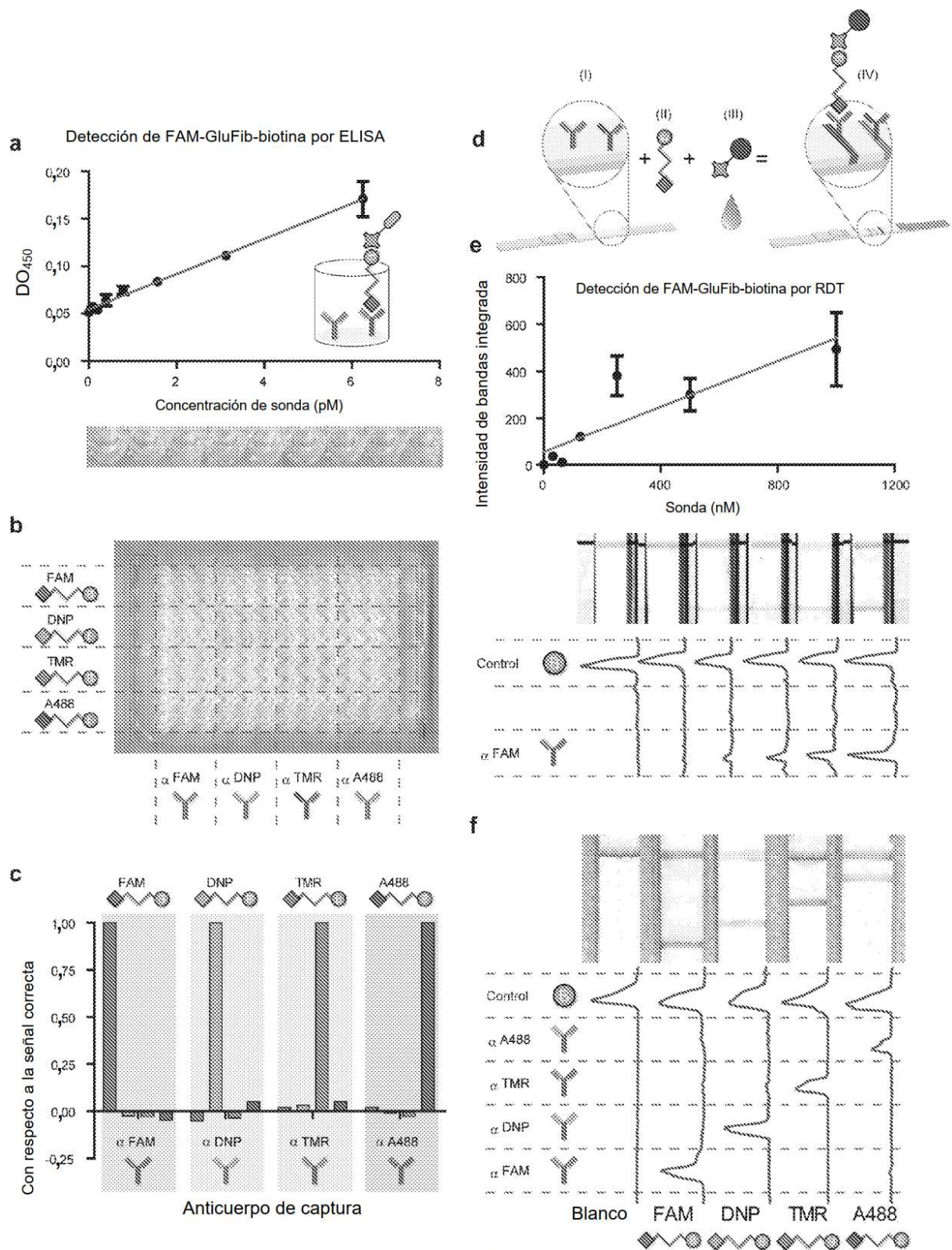


Figura 15

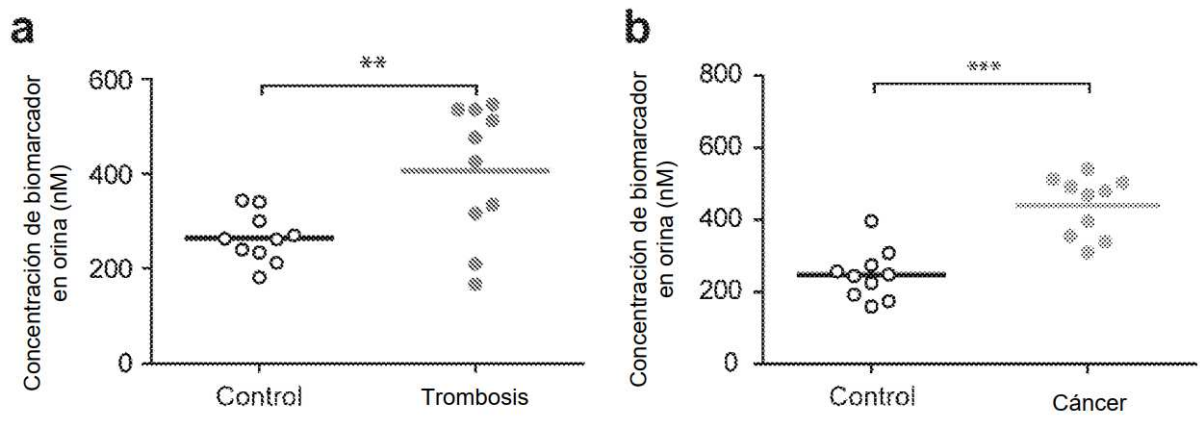


**Figura 16**