



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 382**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/34** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05803987 .6**

96 Fecha de presentación : **09.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1799844**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Procedimientos para detectar objetivos.**

30 Prioridad: **10.09.2004 US 609082 P**  
**10.09.2004 US 609205 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2010**

73 Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**  
**925 Page Mill Road**  
**Palo Alto, California 94304-1013, US**

72 Inventor/es: **Sherwood, Steven W.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 337 382 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**

Procedimientos para detectar objetivos.

**5 Campo de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para la detección de moléculas objetivo presentes en las células y en los tejidos.

**10 Antecedentes de la invención**

La imagen óptica en la tecnología biomédica está muy extendida en el desarrollo de fármacos preclínicos y es cada vez más necesaria en los modelos preclínicos de la enfermedad. La inmunohistoquímica para la investigación y los ensayos clínicos ha sido realizada con cualquiera de fosfatasa alcalina (AP) u horso peroxidasa de rábano (HRP), en particular en las áreas de la biomedicina y del diagnóstico. En algunos procedimientos que se utilizan en ambos sistemas, un anticuerpo específico objetivo primario se une a un tejido. A continuación, se une un anticuerpo secundario conjugado con AP o HRP, que se une al anticuerpo primario. La detección del objetivo se visualiza al observar la reacción de la enzima con un sustrato que se agrega a la mezcla de reacción. En la mayoría de los casos, la enzima actúa sobre el sustrato para producir un cambio de color en la muestra de ensayo, debido a la precipitación de los productos de la reacción en los tejidos. En la mayoría de los procedimientos, la detección se visualiza con técnicas estándar de microscopía de luz.

Sin embargo, estos sistemas tienen limitaciones. Por ejemplo, la gama de colores para distinguir los productos de la reacción es limitada, y la distinción, incluso dos colores, es a veces problemática, mientras que distinguir más de dos colores no es actualmente factible. Del mismo modo que otros que no son sistemas altamente especializados, estos procedimientos no se utilizan para generar productos de reacción fluorescente. Además, las enzimas endógenas presentes en los tejidos (*por ejemplo*, fosfatasas alcalinas) pueden conducir a altos fondos (*es decir*, "ruido"). Como resultado, es necesario el bloqueo de las medidas especiales necesarias para evitar reacciones no deseadas y/o procedimientos prolongados de tinción para destruir las enzimas endógenas antes de la tinción. Por lo tanto, se necesitan mejores procedimientos para la detección de objetivos de tejidos.

El documento US 5.443.986 describe la detección de la actividad de la enzima utilizando sustratos fluorogénicos.

El documento US2004/0115742 describe procedimientos para la identificación de las interacciones entre el ligando-receptor de los pares dentro de las células, al vincular el ligando con una molécula de enzima reportera.

El documento EP 0 379 048 describe ensayos de  $\beta$ -lactamasas empleando sustratos de precipitación cromogénicos.

**40 Descripción de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para la detección de moléculas objetivo presentes en las células y en los tejidos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos *ex vivo* para la detección de al menos un objetivo de al menos una célula, que comprende las etapas de: proporcionar al menos una célula de prueba de al menos un objetivo, exponer al menos una célula de prueba a un agente dirigido que se une al objetivo, donde el agente dirigido se conjuga con una enzima  $\beta$ -lactamasa, para producir un objetivo unido y, además, en el que la enzima es capaz de separar un sustrato para producir un producto fluorescente precipitante; exponer el objetivo unido al sustrato en condiciones tales que la enzima rompe el sustrato para producir dicho producto y detectar del producto. En algunas realizaciones preferidas, la por lo menos una célula de prueba se ha obtenido de un animal. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la por lo menos una célula de prueba es una célula humana. En realizaciones adicionales, el agente dirigido es seleccionado del grupo formado por anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpos. En algunas realizaciones particularmente preferidas, es agente está biotinilado. En otros modos de realización preferidos, el sustrato está biotinilado. En otras realizaciones preferidas, dicho al menos un objetivo comprende al menos un marcador de cáncer. En realizaciones adicionales, la al menos una célula es *in vitro*, o *in situ*.

La presente invención también proporciona procedimientos *ex vivo* para la detección de al menos un objetivo de al menos una célula, que comprende las etapas de: proporcionar al menos una célula de prueba de al menos un objetivo, exponer al menos una célula de prueba a un agente dirigido que se une al objetivo, donde se conjuga el agente dirigido a una molécula reportera, para producir un objetivo determinado; exponer el objetivo unido a una enzima  $\beta$ -lactamasa para producir un complejo dirigido, en el que la enzima es capaz de separar un sustrato para producir una precipitación de productos fluorescentes; exponer el complejo dirigido al sustrato en condiciones tales que la enzima rompe el sustrato para producir dicho producto y la detección del producto. En algunas realizaciones preferidas, la por lo menos una célula de prueba se ha obtenido de un animal. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la por lo menos una célula de prueba es una célula humana. En realizaciones adicionales, el agente dirigido es seleccionado del grupo formado por anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpos. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el agente dirigido está biotinilado. En otros modos de realización preferidos,

## ES 2 337 382 T3

el sustrato está biotinilado. En otras realizaciones preferidas, dicho al menos un objetivo comprende al menos un marcador de cáncer. En realizaciones adicionales, la al menos una célula es *in vitro* o *in situ*.

5 En algunas realizaciones, el agente selectivo es administrado a una muestra de prueba. En algunas realizaciones preferidas, la muestra es una muestra de tejido obtenida de un animal. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la muestra de tejido se ha obtenido de un ser humano.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un agente dirigido a por lo menos una célula de al menos un objetivo, una enzima  $\beta$ -lactamasa, y un sustrato capaz de ser digerido por la enzima para producir un producto de precipitación fluorescente, para la fabricación de una composición para la imagen óptica en un paciente:

i) en donde dicho agente está conjugado con una enzima  $\beta$ -lactamasa, o

15 ii) en donde dicho agente se conjuga con una molécula reportera y la enzima  $\beta$ -lactamasa es capaz de formar un complejo con un objetivo unido a dicho agente conjugado.

20 En algunas realizaciones preferidas, el agente dirigido, y la enzima se acoplan y luego se administran como una molécula de fusión. En algunas realizaciones preferidas, el agente dirigido y la enzima se acoplan en una molécula de fusión mediante clonación y procedimientos estándar de expresión. En algunas realizaciones alternativas, el acoplamiento del agente dirigido y la enzima se produce a través de su exposición a al menos un producto químico de reticulación covalente. En algunas realizaciones preferidas, el al menos un agente químico de reticulación es seleccionado del grupo formado por agentes tiol-tiol, agentes amina-amina, agentes amina-tiol, agentes amia-ácido carboxílico, agentes tiol-ácido carboxílico y agentes de acoplamiento de éter. En algunas realizaciones alternativas preferidas, el acoplamiento se produce de manera no-covalente. En alguna de estas realizaciones preferidas, el acoplamiento no covalente se produce a través de acoplamiento no-biotina-avidina/estreptavidina. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce a través una unión hidrofóbica. En algunas realizaciones alternativas preferidas, el acoplamiento se produce mediante unión iónica. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce mediante la interacción del ácido nucleico, en el que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos modificados o sin modificar. En otras realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce a través de interacciones de ácidos nucleicos sin modificar. En algunas realizaciones preferidas, las interacciones de ácido nucleico sin modificar son hibridación ARN-ADN o hibridación ADN-ADN. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce mediante la interacción con al menos un ácido nucleico modificado. En algunas realizaciones preferidas, el al menos un ácido nucleico se selecciona del grupo formado por fosfotiotasas, basadas en morfolina, y/o cualquier otro ácido nucleico.

35 En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce a través de la detección de luz. En algunas realizaciones preferidas, el procedimiento de detección de luz se selecciona del grupo que consiste en fluorescencia, fosforescencia, dispersión de la luz, microscopía de campo claro, y/o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones alternativas, la detección comprende además la detección de diferencias en el color y/o la intensidad del color. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce mediante sistemas de detección óptica sensibles a la radiación electromagnética en el rango de aproximadamente 400 nanómetros a 800 nanómetros aproximadamente. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce por la exposición de la luz a película fotográfica, dispositivo acoplado por carga (CCD) y/o detectores de tubos fotomultiplicadores. En algunas realizaciones preferidas, el fotomultiplicador detector de tubo está ajustado específicamente para el rango espectral de fotones emitidos por el producto de la enzima y el sustrato de reacción.

45 En la presente invención, la enzima es capaz de separar el anillo betalactámico de un anillo betalactámico que contiene el compuesto. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la enzima que separa el anillo betalactámico de algunos antibióticos de uso común, como la penicilina, cefalosporinas, y sus derivados. En algunas realizaciones preferidas, el resultado de dicha separación es la eliminación del anillo betalactámico, seguido por la liberación y el destemplado de un producto fluoróforo. La presente invención hace uso de beta-lactamasa ("BLA").

55 La presente invención proporciona procedimientos en los que el sustrato es una molécula orgánica que no es fluorescente en la proximidad de una segunda molécula orgánica unida de manera covalente, y en caso de liberación enzimática de la molécula en segundo lugar, el sustrato se convierte en un producto y sufre un reordenamiento electrónico, que emite longitudes de onda. En algunas realizaciones preferidas, el sustrato es al menos una de las moléculas indicadas en la Figura 2. En algunas realizaciones preferidas, el sustrato es un compuesto que contiene  $\beta$ -lactamo que comprende un núcleo cefem sustituido en el sitio R2 con un fluoróforo que se apaga hasta que sea liberado por una reacción beta de eliminación tras la apertura hidrolítica del anillo de lactamo (*Ver Figura 2B; Ver también*, Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Tabla 45-2, McGraw Hill [1996]).

65 En algunas realizaciones preferidas, el producto se mantiene relativamente cerca del sitio de la separación. En algunas realizaciones preferidas alternativas, el producto no se difunden más allá de 1 a aproximadamente 5 diámetros de célula de distancia del sitio de la separación. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce relativamente cerca del sitio de la separación. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 diámetros de célula de distancia del sitio de la separación.

En algunas realizaciones alternativas preferidas, el agente selectivo se selecciona del grupo formado por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, nanocuerpos, nanopartículas, ligandos de moléculas pequeñas, ligandos de receptores y proteínas que se unen a objetivos como citocinas o factores de crecimiento o factores de transcripción.

5 En algunas realizaciones particularmente preferidas, el objetivo se selecciona del grupo formado por células cancerosas, líneas celulares, cultivos celulares, extractos tumorales, tejido canceroso, órganos cancerosos, moléculas asociadas con una célula cancerosa, moléculas asociadas con una línea de células, moléculas asociadas a cultivos celulares, extractos tumorales, tejidos cancerosos, órganos cancerosos y células cancerosas, moléculas asociadas a un órgano asociado a una célula cancerosa, líneas celulares o cultivos celulares, extractos tumorales o un tejido u órgano canceroso.

15 En algunas realizaciones preferidas, el objetivo es un antígeno. En algunas realizaciones particularmente preferida, el antígeno se selecciona del grupo formado por anticuerpos dirigidos contra al menos un antígeno seleccionado del grupo consistente en glicoproteína transmembrana muc-1, (oncoproteína), antígeno pancarcinogénico Tag72, antígeno carcinoembrionario (CEA), células B restringidas con sialoglicoproteína CD22, dominio B de fibronectina extra (ED-B), proteína transmembrana A33, y proteína de activación de fibroblastos (FAP).

### Descripción de las figuras

20 La figura 1 presenta la secuencia de aminoácidos de una beta-lactamasa (SEQ ID NO: 2), así como la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico que codifica una beta-lactamasa (SEQ ID NO: 1). El Grupo 1A proporciona la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2), mientras que el Grupo 1B proporciona la secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 1) que codifica la beta-lactamasa establecida en la SEQ ID NO: 1. Otras enzimas, y otras lactamasas están destinadas estar en el alcance de la invención, y la secuencia no está destinada a ser limitativa.

25 La Figura 2 proporciona estructuras de precipitación fluorogénicas reporteras de lactamasas. El Grupo 2A proporciona 7-(2-tienilaetamido)-3-(3-(6-cloro-4 (3H)-quinazolinona) 4-clorofeniloximetil-□□-cefem-4-ácido carboxílico S-óxido, mientras que los paneles 2B-2F proporcionan las estructuras de precipitación adicional reporteras fluorogénicas de lactamasa. Estas estructuras no están destinadas a ser limitativas, y otros desencadenantes reporteros fluorogénicos de lactamasa encuentran uso en la presente invención.

35 La figura 3 muestra la especificidad y la localización de la tinción de células en cultivo mixto con un antígeno carcinoembrionario (CEA) de la molécula de unión de anticuerpo (CAB). Como se indica en esta fotografía, una marcada diferencia morfológica se observa entre las células CEA+ (*es decir*, células que soportan el antígeno CEA) y las células no-CEA (*es decir*, células que carecen del antígeno CEA). También se pueden observar marcadas diferencias de tinción entre las células.

40 La figura 4 muestra la especificidad y la localización de la tinción en cultivo de células humanas mezcladas usando una molécula CAB en células cultivadas fijadas con formaldehído. El panel A muestra una fotomicrografía de fase, mientras que el panel B muestra una fotomicrografía de fluorescencia, y el panel C muestra una fase combinada y fotomicrografía fluorescente.

45 La figura 5 muestra la especificidad y la localización de la tinción en un cultivo celular mixto usando CAB 1.2 en tejido congelado con flash, tal como se describe en el ejemplo 4. El panel A proporciona una fotomicrografía de sustrato, mientras que el panel B proporciona una fotomicrografía de pan-citoqueratina, y el panel C proporciona una fotomicrografía de fase con células humanas y de ratón.

50 La Figura 6 proporciona resultados de un chip tisular humano ("TMA") que comprende tejidos normales y cancerosos. El panel 6A muestra la tinción TMA, mientras que el panel 6B proporciona un gráfico que ilustra la intensidad de la tinción. En el panel 6B, el eje y muestra la media de la intensidad de la tinción en la zona positiva de la tinción, mientras que el eje x indica el tipo de tejido.

La figura 7 muestra los elementos individuales de un TMA, como se describe en el ejemplo 6.

55 La figura 8 proporciona fotomicrografías de tejido normal de colon mono con parafina teñida con CAB1.2. En el panel A, la muestra carecía de BLA, pero contenía sustrato. En el panel B, BLA y sustrato estuvieron presentes. Como puede verse en la foto, la tinción de las secciones es específica y brillante.

60 La Figura 9 proporciona fotografías de múltiples TMAs teñidos para un cribado de disposición de tejido de alto rendimiento para la expresión del antígeno específico en el tejido normal y enfermo.

La Figura 10 proporciona un esquema que muestra un procedimiento general para el acoplamiento de beta-lactamasa a anticuerpos, tal como se describe en el ejemplo 9.

65 La Figura 11 proporciona una fotomicrografía de tejido humano de cáncer de colon con parafina teñido con anti-CEA (Biomeda) biotinilado, estreptavidina y beta-lactamasa biotinilada seguida por el sustrato.

## ES 2 337 382 T3

La Figura 12 proporciona secuencias de moléculas CAB. El panel 12A proporciona un mapa del plásmido para pME27.1. El panel 12B proporciona la secuencia CAB, indicando la cadena pesada (SEQ ID NO: 3) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 4), así como dominios de enlace (SEQ ID NO: 5), y BLA (SEQ ID NO: 6).

5 La Figura 13 proporciona datos de comparación de secuencias utilizados en la construcción de la molécula CAB. El panel 13A proporciona una comparación de las frecuencias observadas de los cinco aminoácidos más abundantes en las secuencias humanas de cadena pesada. El panel 13B proporciona una comparación de las frecuencias observadas de los cinco aminoácidos más abundantes en alineación de secuencias de cadenas humanas ligeras.

10 La Figura 14 proporciona datos relevantes para el aislamiento de una molécula CAB, tal como se describe en el Ejemplo 1. El panel 14A proporciona un gráfico que muestra la curva de unión de la actividad BLA de unión, en comparación con la actividad BLA añadida. El panel 14B proporciona una fotografía de un gel de SDS-PAGE de 7 variantes de NA05.

15 La Figura 15 proporciona una visión de imágenes de una realización del procedimiento de tinción y el procedimiento de imagen. El panel 15A muestra una realización del procedimiento de tinción, mientras que el panel 15B proporciona una realización del procedimiento de imagen.

20 La Figura 16 proporciona fotografías de imágenes *in vivo* con un reportero de lactamasa tal como se describe en el Ejemplo 10. Los paneles 16A-16G muestran el uso de varios espectros de excitación y emisión, tal como se indica en los dibujos.

### Descripción de la invención

25 La presente invención proporciona procedimientos para la detección de moléculas objetivo presentes en células y tejidos.

A menos que se defina aquí lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia objeto a la que la presente invención pertenece. Por ejemplo, Singleton y Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2a ed., John Wiley and Sons, NY (1994); y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los expertos en la materia diccionarios generales de muchos de los términos utilizados en la invención. Aunque cualesquiera procedimientos y materiales, similares o equivalentes a los aquí descritos encuentran uso en la práctica de la presente invención, se describen aquí procedimientos y materiales preferidos. Por consiguiente, los términos definidos a continuación se describen de manera más completa con referencia a la memoria en su conjunto. Además, tal como se utilizan aquí, el singular “un”, “una” y “el” incluyen la referencia en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40 El término “*in situ*” tal como se usa aquí, designa una relación o proximidad que se deriva de una asociación específica entre una sustancia (*por ejemplo*, una molécula), y células intactas. Las células pueden ser únicas o múltiples y pueden estar vivas o muertas. Las células intactas incluyen, pero no se limitan a las que se encuentran en solución o en superficies no biológicas (*por ejemplo*, transferencias de membranas PVP, etc.) En algunas realizaciones preferidas, el término se refiere a células que se encuentran en su ubicación natural (*por ejemplo*, dentro de un órgano o tejido).

45 El término “*ex vivo*” tal como se usa aquí, se refiere a células de un tejido, pero no dentro de un organismo intacto. Así, en realizaciones preferidas, el término se emplea para indicar células y/o tejidos que se encuentran fuera del cuerpo vivo. En algunas realizaciones, las células o tejidos no son procesados para su conservación. Por lo general, *ex vivo* se refiere a células y/o tejidos vivos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a sangre completa, hígado, riñón y corazón. En algunas realizaciones, el término se utiliza para referirse a órganos que se han eliminado del cuerpo, pero más tarde devueltos al cuerpo.

50 El término “*in vivo*” tal como se usa aquí, se refiere a células, tejidos, etc., dentro de un cuerpo vivo (*por ejemplo*, un organismo intacto). Las células o tejidos *in vivo* contrastan con los que ya no están en un organismo, como las que crecen en recipientes de cultivo de tejidos o en los tejidos fijados y montados (*por ejemplo*, células de IHC y TMA, como se indican aquí).

55 El término “*in vitro*” tal como se usa aquí, se refiere a células, tejidos, etc. que están fuera del cuerpo vivo. El término se refiere más concretamente a un medio artificial, como dentro de tubos de ensayo, frascos de crecimiento, etc.

60 Tal como se usa aquí, “beta-lactamasa” se refiere a cualquier enzima que rompe los anillos beta-lactámicos (*es decir*, una estructura de anillo heteroatómico compuesto por tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno). Los anillos beta-lactámicos son los componentes de varios antimicrobianos, incluyendo pero no limitado a la penicilina, cefalosporina, y otros compuestos relacionados. En algunas formas de realización preferidas, la beta-lactamasa de la presente invención es una enzima nativa, mientras que en algunas otras formas de realización preferidas, la beta-lactamasa de la presente invención es recombinante. En algunas realizaciones también preferidas, las beta-lactamasas de la presente invención se modifican, de manera que las beta-lactamasas estimulan una reacción inmunológica menor que las beta-lactamasas nativas.

Tal como se usa aquí, el término “oligonucleótido recombinante” se refiere a un oligonucleótido creado mediante manipulaciones biológicas moleculares, incluyendo pero no limitado a, la ligadura de dos o más secuencias de oligonucleótidos generados por digestión con enzimas de restricción de una secuencia de polinucleótidos, la síntesis de oligonucleótidos (*por ejemplo*, la síntesis de cebadores u oligonucleótidos) y similares.

Tal como se usa aquí, “beta-lactamasa recombinante” hace referencia a una beta-lactamasa en el que la secuencia de ADN codificante de beta-lactamasa se ha modificado para producir una secuencia de ADN variante (o mutante), que codifica la sustitución, supresión o inserción de uno o más aminoácidos ácidos en la secuencia natural de aminoácidos. Procedimientos adecuados para producir esa modificación son bien conocidos para los expertos en la materia.

El término “molécula de ADN recombinante” como se usa aquí se refiere a una molécula de ADN que está compuesta de segmentos de ADN unidos mediante técnicas de biología molecular.

Tal como se usa aquí, el término “conversión enzimática” se refiere a la modificación de un sustrato de carbono a un nivel intermedio o la modificación de un intermedio para un producto final en contacto con el sustrato o intermedio con una enzima. En algunas realizaciones, el contacto se hace directamente por la exposición del sustrato o intermedio a la enzima adecuada. En otras realizaciones, el contacto comprende la exposición del sustrato o intermediario al organismo que se expresa y/o excreta la enzima, y/o metaboliza el sustrato deseado y/o intermedio al que desee intermediar y/o producto final, respectivamente.

Tal como se usa aquí, proteínas de “tipo salvaje” y “nativo” son las que se encuentran en la naturaleza. Los términos “secuencia de tipo salvaje” y “gen de tipo salvaje” se utilizan aquí indistintamente, para referirse a una secuencia que es nativa o natural en una célula huésped. En algunas realizaciones, la secuencia de tipo salvaje se refiere a una secuencia de interés que es el punto de partida de un proyecto de ingeniería de proteínas. Los genes que codifican proteína que se produce de manera natural (*es decir*, precursora) pueden obtenerse de acuerdo con los procedimientos generales conocidos por los técnicos en la materia. Los procedimientos comprenden generalmente sondas marcadas de sintetización que tienen secuencias putativas que codifican regiones de la proteína de interés, preparando librerías genómicas a partir de organismos que expresan la proteína, y el cribado de las librerías para el gen de interés mediante hibridación de las sondas. A continuación se mapean y secuencian clones de hibridación de manera positiva.

El término “muestra” tal como aquí se utiliza, se utiliza en su sentido más amplio. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el término se utiliza en referencia a una muestra (*por ejemplo*, una alícuota), que comprende un objetivo de interés que está siendo analizado, identificado, modificado y/o comparado con otros objetivos. Así, en la mayoría de los casos, este término se utiliza en referencia al material que incluye un péptido o proteína que es de interés.

Tal como se usa aquí, los términos “purificado” y “aislado” se refieren a la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, las beta-lactamasas son purificadas mediante la eliminación de proteínas contaminantes y otros compuestos en una solución o preparación que no son beta-lactamasas. En algunas realizaciones, las beta-lactamasas recombinantes se expresan en células huésped bacterianas y estas beta-lactamasas recombinantes son purificadas mediante la eliminación de otros constituyentes de células huésped; el porcentaje de polipéptidos de beta-lactamasa recombinante se aumenta así en la muestra.

El término “gen” tal como aquí se utiliza, se refiere a una molécula compuesta por dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez, dependen de la función o el uso final de los oligonucleótidos. Los genes pueden prepararse mediante cualquier procedimiento apropiado, incluyendo, por ejemplo, clonación de secuencias apropiadas y síntesis química directa por cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica (*véase, por ejemplo*, Goodchild, *Bioconjugate Chem.*, 1:165-187 [1990]), incluyendo pero no limitado al procedimiento fosfotriéster (*véase, por ejemplo*, Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 68:90-99), el procedimiento fosfodiéster (*véase por ejemplo*, Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 68:109-151 [1979]), el procedimiento dietilfosforamida (*véase, por ejemplo*, Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 22:1859-1862), y el procedimiento de soporte sólido (*véase, por ejemplo*, la patente US 4.458.066).

El término “gen de fusión”, tal como aquí se utiliza, designa una construcción genética que se produce cuando cualquier gen se fusiona con otro o cualesquiera dos secuencias que codifican dominios de proteínas se fusionan entre sí. Todos los procedimientos de fusión conocidos están destinados a estar en el alcance de la invención.

El término “proteína” se utiliza indistintamente aquí, así como en la técnica, con los términos “péptido” y “polipéptido”, y se refiere a una molécula compuesta por dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

Las familias de los residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de base (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (*por ejemplo*, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano, cisteína, glicina), cadenas laterales beta-ramificadas (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Abreviaturas de aminoácidos estándar de tres letras o una se pueden utilizarse aquí, así como en la técnica. Un experto en la materia puede hacer sustituciones equivalentes (*por ejemplo*, Un aromático sustituido por un aromático) y tales sustituciones equivalentes están pensadas para estar en el alcance de las reivindicaciones, en su caso.

## ES 2 337 382 T3

Los péptidos, polipéptidos y proteínas de la invención también puede comprender uno o varios aminoácidos no clásicos. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no limitado a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido butírico  $\alpha$ -amino, ácido 4-aminobutírico (4-Abu), ácido 2-aminobutírico (2-Abu), ácido 6-amino hexanoico (Ahx), ácido 2-amino butírico (2-AIB), ácido 3-amino propionico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoro-aminoácidos y aminoácidos de diseño tales como aminoácidos  $\beta$ -metil, aminoácidos  $C\alpha$ -metil y aminoácidos  $N\alpha$ -metil.

El término “proteína de fusión” se utiliza aquí para designar a una proteína que se produce cuando las proteínas se fusionan con otra. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión se producen cuando un gen se fusiona con otro para codificar una “proteína de fusión”, y luego el gen de fusión resultante se expresa y produce una proteína de fusión. Varios procedimientos de fusión son conocidos para los expertos en la materia y encuentran su uso en la presente invención.

El término “aglutinante”, como aquí se utiliza, se refiere a una molécula que se ha determinado que se une a un objetivo, tal como se describe aquí. La verificación de la unión se logra a través de medios apropiados conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la unión se determina cualitativamente, mientras que en otras realizaciones la unión se determina cuantitativamente. Además, la presente invención proporciona una serie de todas las afinidades de unión, ya que el alcance de la invención depende de la finalidad de los ensayos contemplados.

Tal como se usa aquí, el término “complejo objetivo” se refiere a un objetivo que ha sido unido mediante un agente dirigido y una enzima. Por ejemplo, en algunas realizaciones particularmente preferidas, el “agente dirigido” es un anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo conjugado en una molécula reportera que se ha unido a un objetivo (*es decir*, para formar un “objetivo unido”). Este objetivo unido se une a continuación a una enzima para producir un “complejo objetivo”. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la enzima está unida al objetivo unido a través de la interacción entre biotina y avidina o estreptavidina.

Los términos “unión específica” o “específicamente unido” cuando se utilizan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (*es decir*, el determinante antigénico o epítipo) de la proteína. En otras palabras, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteínas específica en lugar de a las proteínas en general. Por ejemplo, si un anticuerpo que es específico para el epítipo “A”, la presencia de una proteína que contiene el epítipo A (o A libre, sin etiqueta) en una reacción que contiene “A” marcado, el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

Como se usa aquí, el término “cultivo celular” se refiere a cualquier cultivo *in vitro* de células. Incluidas en este término están las líneas celulares continuas (*por ejemplo*, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares finitas (*por ejemplo*, células no transformadas), y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*.

Como se usa aquí, el término “tejido” se refiere a un grupo o capa de células especializadas de manera similar, que realizan determinadas funciones especializadas. En algunos tejidos, las células de un solo tipo están presentes, mientras que en otros tejidos, están presentes células de diferentes tipos. El término incluye pero no se limita a linfoide, linfadenoides, adiposo, óseo, aerolar, cartilaginosa, conectivo, elástico, endotelial, epitelial, fibroso, glandular, linfoide asociado al intestino (GALT), indiferente, intersticial, reticular, mesenquimal, mieloide, muscular, nervioso, óseo, esquelético, subcutáneo, y otros tipos de tejidos.

Como se usa aquí, el término “órgano” se refiere a cualquier parte del cuerpo algo independiente que realiza una función especializada. El término incluye, pero no se limita al corazón, riñones, hígado, bazo, piel, estómago, intestino grueso, intestino delgado, páncreas, ojos, cerebro, lengua, pulmones, órganos reproductores, etc.

Una “célula transformada” es un célula o línea celular que ha adquirido la capacidad de crecer en cultivo celular para muchas generaciones múltiples, la capacidad de crecer en agar blando y la capacidad de crecimiento de las células no se ha inhibido mediante el contacto célula-célula. En este sentido, la transformación se refiere a la introducción de material genético extraño en una célula u organismo. La transformación puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido, que permite la introducción exitosa de ácidos nucleicos en las células y que da lugar a la expresión del ácido nucleico introducido. “Transformación” incluye pero no está limitado a procedimientos como transfección, microinyección, electroporación, y lipofección (transferencia génica mediada con liposomas). La transformación puede llevarse a cabo mediante el uso de cualquier vector de expresión adecuado. Además, la transformación se refiere a las células que han sido transformadas, naturalmente, generalmente a través de mutación genética.

Los términos “transformantes” y “células transformadas” abarcan la célula transformada primaria (procariótica o eucariótica) y cultivos derivados de esa celda sin tener en cuenta el número de transferencias. Cualquier progenie puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie mutante que tiene la misma funcionalidad que la cribada para la célula transformada originalmente se incluye en la definición de transformantes.

Como se usa aquí, “antígeno” se refiere a una molécula que es reconocida y unida mediante un anticuerpo. En algunas realizaciones, los antígenos son inmunógenos (*es decir*, una respuesta inmune).

El término “determinante antigénico” como se usa aquí se refiere a la porción de un antígeno que se pone en contacto con un anticuerpo particular (*es decir*, un epítipo). Cuando una proteína o un fragmento de una proteína que se utiliza para inmunizar un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región o estructura tridimensional en la proteína; estas regiones o estructuras se refieren como determinantes antigénicos. Un factor determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (*es decir*, el “inmunógeno” utilizado para desencadenar la respuesta inmune) para su unión a un anticuerpo. Ejemplos de “antígenos de interés”, incluyen antígenos de cáncer, especialmente aquellos cuya sobreexpresión se correlaciona con una patología específica (*por ejemplo*, una indicación específica de cáncer).

“Anticuerpos” (Ab) e “inmunoglobulina” (Ig) como aquí se utilizan, se refieren a las definidas como una glicoproteína producida por las células B y las células plasmáticas de humanos y otros animales, que se une con alta especificidad a un antígeno (usualmente, pero no siempre, un péptido) o un antígeno estructuralmente similar, que ha generado su producción. Los anticuerpos pueden ser producidos mediante cualquiera de los procedimientos conocidos y pueden ser policlonales o monoclonales. El término también abarca anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, inmunoglobulinas o anticuerpos o fragmentos funcionales de un anticuerpo que se unen a un antígeno. Ejemplos de tales entidades funcionales incluyen moléculas de anticuerpo completo, fragmentos de anticuerpos, como Fv, Fv de única cadena, regiones determinantes de complementariedad (CDRs), V<sub>L</sub> (región variable de cadena ligera), V<sub>H</sub> (región variable cadena pesada) y cualquier combinación de éstas o de cualquier otra parte funcional de un péptido de inmunoglobulina capaz de unirse al antígeno objetivo.

Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden prepararse con varios inmunógenos.

Varios procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizarse para la producción de anticuerpos policlonales. En algunas realizaciones para la producción de anticuerpos, varios animales huésped (incluyendo pero no limitado a conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc.) están inmunizados mediante inyección con el péptido correspondiente a un objetivo de interés en la presente invención. En una realización preferida, el péptido se conjuga a un portador inmunogénico (*por ejemplo*, difteria toxoide, albúmina de suero bovino (BSA), o hemocianina de molusco [KLH]). Varios adyuvantes se puede utilizar para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo pero no limitado a Freund (completa o incompleta), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales, como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como BCG (bacilo de Calmette-Guerin), y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporciona la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo (*véase, por ejemplo*, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estas incluyen pero no se limitan a la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, *Nature* 256:495-497 [1975]), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma células B humanas (*véase, por ejemplo*, Kozbor *et al.* *Immunol. Today* 4:72 [1983]), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (*véase, por ejemplo*, Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96 [1985]). En algunas realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales de la clase IgG.

En una realización adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales se producen en animales libres de gérmenes (*véase, por ejemplo*, PCT/US90/02545). Según la invención, los anticuerpos humanos encuentran uso y se puede obtener mediante el uso de hibridomas humanos (*véase, por ejemplo*, Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030 [1983]) o mediante la transformación de linfocitos B humanos con virus EBV *in vitro* (*ver por ejemplo*, Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, páginas 77-96 [1985]).

Según la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (patente US 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena única que reconocen específicamente una molécula de interés. En algunas realizaciones, las técnicas descritas para la construcción de librerías de expresión Fab (*véase por ejemplo*, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 [1989]) se utilizan para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales con la especificidad deseada.

Los fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo (región de unión del antígeno) de la molécula del anticuerpo pueden ser generados mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen pero no están limitados a: el fragmento F(ab')<sub>2</sub> que puede ser producido mediante digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos de Fab', que pueden ser generados mediante la reducción de puentes disulfuro del fragmento F(ab')<sub>2</sub>, y los fragmentos Fab que pueden ser generados mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, el cribado de los anticuerpos deseados se puede realizar mediante técnicas conocidas en la técnica (*por ejemplo*, radioinmunoensayo, ELISA [ensayo inmunoabsorbente de enlace de enzima], inmunoensayos “sándwich”, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* [usando oro coloidal, enzimas o marcas de radioisótopos, por ejemplo], Western Blots, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (*por ejemplo*, ensayos de aglutinación en gel, ensayos

de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación de complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A, y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.

5 En una realización, la unión del anticuerpo se detecta mediante la detección de una marca sobre el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo en el anticuerpo primario. En otra realización, se marca el anticuerpo secundario. Muchos medios son conocidos en la técnica para la detección de la unión en un inmunoensayo y están dentro del ámbito de la presente invención. (Como es bien sabido en la técnica, el péptido inmunogénico debe proporcionarse libre de la molécula portadora usada en cualquier protocolo de inmunización. Por ejemplo, si el péptido estaba conjugado a KLH, puede ser conjugado a BSA, o se utilizado directamente, en un ensayo de cribado).

“Teñir”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier número de procesos conocidos por los expertos en la materia que se utilizan para visualizar mejor un componente específico(s) y/o característica(s) de una célula o células.

15 El término “objetivo” tal como se usa aquí, se refiere a una sustancia de interés. En algunas realizaciones preferidas, los objetivos se identifican mediante la exposición de muestras a las proteínas de fusión de la presente invención. En algunas realizaciones, el objetivo es una célula cancerosa, líneas celulares o cultivos celulares, extracto tumoral, tejido u órgano canceroso, o cualquier molécula asociada con una célula cancerosa, líneas celulares o cultivos celulares, extracto tumoral, o tejido u órgano canceroso. En algunas realizaciones, los antígenos son los objetivos.

20 El término “extracto tumoral”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una muestra obtenida de una célula cancerosa, líneas celulares o cultivos de células o de un tejido u órgano canceroso.

25 El término “acoplamiento”, tal como aquí se utiliza, se refiere al proceso de interacciones covalentes y/o no covalentes entre dos fracciones. En realizaciones preferidas, las fracciones acopladas son fracciones objetivo y catalíticas. El acoplamiento se puede lograr a través de cualquier medio adecuado, incluyendo pero no limitado al uso de clonación y procedimientos estándar de expresión, agentes de reticulación covalente química, tales como agentes tiol-tiol, agentes amina-amina, agentes amina-tiol, agentes amino-ácido carboxílico, agentes tiol-ácido carboxílico, agentes de acoplamiento de éter, medios no covalentes, como a través de acoplamiento non-biotina-avidina/estreptavidina, unión hidrofóbica, unión iónica, y/o a través de interacciones de ácido nucleico, en el que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos modificados o no modificados.

30 El término “adherente”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la adhesión de los productos de reacción y otros compuestos (*por ejemplo*, precipitados), a la célula y/o otras superficies. Este proceso de adhesión puede realizarse por cualquier medio, incluyendo pero no limitado a la interacción hidrofóbica de la superficie celular o solubilidades diferenciales, de manera que el producto se adhiere a la superficie celular, se difunde o es transportado activamente en las células.

### Descripción detallada de la invención

40 La presente invención soluciona los problemas relacionados con los procedimientos inmunohistoquímicos estándar utilizados actualmente que dependen de la HRP y/o AP. El procedimiento básico implica la unión de un anticuerpo primario, seguida por la unión de cualquier enzima lactamasa objetivo seguida por la adición de determinados reporteros de lactamasa fluorescentes que son incoloros y no fluorescente hasta que la lactamasa rompe la molécula, liberando un precipitado, un fluoróforo muy estable que se adhiere fuertemente al objetivo. En principio, la lactamasa puede conjugarse en cualquier entidad objetivo incluyendo anticuerpos, péptidos, ligandos de receptores, scFvs y nanocuerpos. Todo lo que se requiere es una fracción objetivo. La reacción es extremadamente simple y rápida de ejecutar y el bloqueo no es necesario. Debido a que la lactamasa no es una enzima de mamíferos, no hay problemas de fondo debido a la actividad de las enzimas endógenas. Además, el sustrato de precipitación ha demostrado no sólo ser simple y rápido de usar, sino muy específico (*es decir*, las células “malignas” - aquellas que no expresan un antígeno de interés, no están marcadas). Además, el reactivo se adapta bien a procedimientos inmunohistoquímicos, con células, tejidos, criosecciones, tejidos embebidos en parafina, y disposiciones de tejidos (incrustadas en criosecciones o parafina).

55 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos *ex vivo* para la detección de al menos un objetivo de al menos una célula, que comprende las etapas de proporcionar al menos una célula de prueba que tiene al menos un objetivo, exponer al menos una célula de prueba a un agente dirigido que se une al objetivo, donde el agente dirigido se conjuga en una enzima  $\beta$ -lactamasa, para producir un objetivo unido y, además, en el que la enzima es capaz de separar un sustrato para producir un producto fluorescente precipitado; exponer el objetivo unido al sustrato bajo condiciones tales que la enzima rompe el sustrato para producir dicho producto y detectar el producto. En algunas realizaciones preferidas, la por lo menos una célula de prueba se ha obtenido de un animal. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la por lo menos una célula de prueba es una célula humana. En realizaciones adicionales, el agente dirigido es seleccionado del grupo formado por anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpos. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el agente dirigido está biotilado. En realizaciones preferidas adicionales, el sustrato está biotilado. En otras realizaciones preferidas, la al menos un objetivo comprende al menos un marcador de cáncer. En realizaciones adicionales, la al menos una célula es *in vitro* o *in situ*.

La presente invención también proporciona procedimientos *ex vivo* para la detección de al menos un objetivo de al menos una célula, que comprende las etapas de: proporcionar al menos una célula de prueba de al menos un objetivo, exponer al menos una célula de prueba a un agente dirigido que se une al objetivo, en el que el agente dirigido se conjuga en una molécula reportera, para producir un objetivo determinado; exponer el objetivo unido a una enzima  $\beta$ -lactamasa para producir un complejo objetivo, en el que la enzima es capaz de separar un sustrato para producir un producto fluorescente precipitado; exponer el complejo objetivo al sustrato en condiciones tales que la enzima rompe el sustrato para producir dicho producto y detectar el producto. En algunas realizaciones preferidas, la por lo menos una célula de prueba se ha obtenido de un animal. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la por lo menos una célula de prueba es una célula humana. En realizaciones adicionales, el agente dirigido se selecciona del grupo formado por anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpos. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el agente dirigido está biotinilado. En otras realizaciones preferidas, el sustrato está biotinilado. En otras realizaciones preferidas, dicho al menos un objetivo comprende al menos un marcador de cáncer. En realizaciones adicionales, la al menos una célula es *in vitro* o *in situ*.

En algunas realizaciones, el agente dirigido es administrado a una muestra de prueba. En algunas realizaciones preferidas, la muestra es una muestra de tejido obtenido de un animal. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la muestra de tejido se ha obtenido de un ser humano.

En algunas realizaciones preferidas, el agente dirigido y la enzima se acoplan y luego se administran como una molécula de fusión. En algunas realizaciones preferidas, la enzima y el agente dirigido se acoplan en una molécula de fusión mediante clonación y procedimientos estándar de expresión. En algunas realizaciones alternativas, el acoplamiento del agente dirigido y la enzima se produce a través de la exposición a al menos un agente de reticulación covalente químico. En algunas realizaciones preferidas, el al menos un agente de reticulación covalente químico se selecciona del grupo formado por agentes tiol-tiol, agentes amina-amina, agentes amina-tiol, agentes amina-ácido carboxílico, agentes tiol-ácido carboxílico y agentes de acoplamiento de éter. En algunas realizaciones alternativas preferidas, el acoplamiento se produce de manera no covalente. En algunas de estas realizaciones preferidas, el acoplamiento no covalente se produce a través de acoplamiento no biotina-avidina/estreptavidina. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce mediante unión hidrofóbica. En algunas realizaciones alternativas preferidas, el acoplamiento se produce mediante unión iónica. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce mediante interacción del ácido nucleico, en el que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos modificados o codificados. En otras realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce a través de interacciones de ácidos nucleicos sin modificar. En algunas realizaciones preferidas, las interacciones ácido nucleico sin modificar son hibridación de ARN-ADN o hibridación ADN-ADN. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce mediante interacciones con al menos un ácido nucleico modificado. En algunas realizaciones preferidas, el al menos un ácido nucleico modificado se selecciona del grupo formado por fosfotiotasas, basadas en morfolino, y/o cualquier otro ácido nucleico modificado.

En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce a través de la detección de luz. En alguna realización preferida, el procedimiento de detección de luz se selecciona del grupo consistente en fluorescencia, fosforescencia, dispersión de luz, microscopía de campo brillante, y/o una combinación los mismos. En algunas realizaciones alternativas, la detección comprende además la detección de diferencias en el color y/o la intensidad del color. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce mediante sistemas de detección óptica sensible a la radiación electromagnética en el intervalo de 400 nanómetros aproximadamente a 800 nanómetros aproximadamente. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce por la exposición de la luz a película fotográfica, un dispositivo acoplado de carga (CCD) y/o detectores de tubos fotomultiplicadores. En algunas realizaciones preferidas, el detector de tubo fotomultiplicador está ajustado específicamente para el rango espectral de fotones emitidos por el producto de la enzima y el sustrato de reacción.

En la presente invención, la enzima es capaz de separar el anillo lactámico de un anillo lactámico que contenga el compuesto. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la enzima separa el anillo lactámico de algunos antimicrobianos de uso común, como penicilina, cefalosporinas, y sus derivados. En algunas realizaciones preferidas, dicha división resulta en la eliminación del anillo betalactámico, seguido por la liberación y el destemplado de un producto fluoróforo. En la presente invención, la enzima es un beta-lactamasa ("BLA").

La presente invención proporciona procedimientos en los que el sustrato es una molécula orgánica que no es fluorescente en proximidad de una segunda molécula orgánica unida de manera covalente, y en caso de liberación enzimática de la segunda molécula, el sustrato se convierte en un producto y sufre un reordenamiento electrónico, que emite longitudes de onda. En algunas realizaciones preferidas, el sustrato es al menos una de las moléculas indicadas en la Figura 2. En algunas realizaciones preferidas, el sustrato es un compuesto que contiene  $\beta$ -lactamo que comprende un núcleo de cefem sustituido en el sitio R2 con un fluoróforo que se apaga hasta que sea liberado mediante una reacción de eliminación beta tras la apertura hidrolítica del anillo lactámico (*ver* la figura 2B; *ver también*, Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Tabla 45-2, McGraw Hill [1996]).

En algunas realizaciones preferidas, el producto se mantiene relativamente cerca del sitio de la separación. En alguna realización preferida alternativa, el producto no se difunde más allá de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 diámetros celulares de distancia del sitio de la separación. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce relativamente cerca del sitio de la separación. En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 diámetros celulares de distancia del sitio de la separación.

## ES 2 337 382 T3

En algunas realizaciones alternativas preferidas, el agente dirigido es seleccionado del grupo formado por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, nanocuerpos, nanopartículas, ligandos de moléculas pequeñas, ligandos de receptores y proteínas que se unen a objetivos tales como citocinas o factores de crecimiento o factores de transcripción.

5

En algunas realizaciones particularmente preferidas, el objetivo se selecciona del grupo formado por células cancerosas, líneas celulares, cultivos celulares, extractos tumorales, tejido canceroso, órganos cancerosos, moléculas asociadas con una célula cancerosa, moléculas asociadas con una línea celular, moléculas asociadas a cultivos celulares, extractos tumorales, tejidos cancerosos, órganos cancerosos y células cancerosas, moléculas asociadas a un órgano asociado a una célula cancerosa, líneas celulares o cultivos celulares, extractos tumorales o tejidos u órganos cancerosos.

10

En algunas realizaciones preferidas, el objetivo es un antígeno. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el antígeno se selecciona del grupo formado por anticuerpos dirigidos contra al menos un antígeno seleccionado del grupo consistente en glicoproteína transmembrana muc-1, (oncoproteína), antígeno pancarcinogénico Tag72, antígeno carcinoembrionario (CEA), sialoglicoproteína CD22 restringida de células B, el dominio B extra de fibronectina (ED-B), la proteína transmembrana A33, y la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

15

En algunas realizaciones que implican la administración de un agente y/o sustrato objetivo, pueden usarse distintas vías de administración, incluyendo pero no limitado a parenteral (*por ejemplo*, Por vía intravenosa), intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, oral, nasal (*es decir*, inhalación), administración tópica, transdérmica, transmucosa y rectal. En algunas realizaciones, soluciones o suspensiones utilizadas para distintas vías de administración incluyen, pero no están limitadas a componentes tales como un diluyente estéril (*por ejemplo*, agua, solución salina, aceites fijos, polietileno glicol, glicerina, propileno glicol, y/u otros disolventes sintéticos), agentes antibacterianos (*por ejemplo*, alcohol benéfico y/o parabenos de metilo), antioxidantes (*por ejemplo*, ácido ascórbico y/o bisulfito de sodio), agentes quelantes (*por ejemplo*, ácido etilendiaminotetraacético); tampones (*por ejemplo*, acetatos, citratos y/o fosfatos), así como agentes para la adaptación de la tonicidad (*por ejemplo*, cloruro de sodio y/o dextrosa). Cuando sea necesario, el pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. En algunas realizaciones, la preparación se encierra dentro de ampollas, jeringas desechables y/o viales de dosis múltiple (*por ejemplo*, frascos de vidrio o de plástico).

20

25

30

Composiciones adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables o dispersiones estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor™ (BASF, Parsippany, NJ), y/o solución salina amortiguadora de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida, en la medida tengan una fácil capacidad de inyectarse. Además, debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (*por ejemplo*, glicerol, propilenglicol, y polietileno glicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de una capa tal como de lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, alcoholes superiores, tales como manitol, sorbitol, y/o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35

40

45

Se pueden preparar soluciones estériles inyectables mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según proceda, seguida por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de la sustancia activa en un medio estéril que contiene un medio de dispersión de base y los demás componentes necesarios. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son de secado al vacío y de secado por congelación, que producen un polvo del ingrediente activo además de los ingredientes adicionales que se deseen de una solución estéril previamente filtrada de la misma.

50

55

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestibles. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o se comprimen en pastillas. A efectos de la administración oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se utiliza en forma de comprimidos, tabletas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar con un soporte líquido para su uso como enjuague bucal, en el que el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral y se ingiere o se agita y expectora.

60

Se pueden incluir agentes de unión y/o materiales adyuvantes compatibles como parte de la composición. Las pastillas, píldoras, cápsulas, tabletas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un ligando, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente de desintegración tal como el ácido algínico, Primogel o almidón de maíz, un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un fluidificante tal como dióxido de silicio coloidal, un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina, o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o sabor de naranja.

65

## ES 2 337 382 T3

Para la administración por inhalación, el agente dirigido y/o el sustrato son entregados en forma de un aerosol de un recipiente a presión o dispensador que contiene un propulsor adecuado (*por ejemplo*, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador).

5 La administración sistémica puede ser transmucosal o transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan penetrantes adecuados en la barrera a penetrar en la formulación. Los penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles  
10 o cremas tal como generalmente se conoce en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (*por ejemplo*, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención de suministro rectal.

15 Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protejan el compuesto contra de la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos los implantes y los sistemas de microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables biocompatibles, tal como acetato de vinilo de etileno, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de estas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse  
20 en el mercado por parte de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) como soporte aceptable. Estos pueden ser preparados de acuerdo a los procedimientos conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la patente US 4.522.811.

25 Es especialmente ventajoso formular composiciones de vía oral o parenteral en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de la unidad de dosis utilizada aquí se refiere a unidades físicamente discretas como dosis únicas adecuadas para el organismo, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos activos para producir el efecto deseado en asociación con el portador requerido. La especificación de las formas de las unidades de dosificación son dictadas por, y dependen directamente de, las  
30 características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que debe alcanzarse y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición como un compuesto activo para el tratamiento de organismos.

Normalmente, la cantidad entregada a un organismo dependerá de una serie de factores, entre ellos, por ejemplo, la vía de administración, la actividad de las moléculas, el grado en que se dirige específicamente a las células deseadas,  
35 tejidos u órganos del organismo, el tiempo necesario para eliminar las moléculas no específicamente unidas del organismo, la masa corporal del organismo, otros medicamentos o tratamientos que se administran al organismo o sujeto, la gravedad de las enfermedades existentes y transcurso anticipado anterior o futuro del tratamiento.

En una realización preferida, el agente dirigido, y la enzima se acoplan proporcionando una molécula de fusión.  
40 En una realización preferida, el acoplamiento se produce ya sea a través de la clonación estándar y procedimientos de expresión o de acoplamiento a través de agentes de reticulación covalente químicos (*ver* por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning Methods, Cold Spring Harbor Laboratory, [1989], para procedimientos de clonación general); proteínas de fusión basadas en enzimas (*véase, por ejemplo*, Bosslet *et al.*, Br. J. Cancer 65:234-238 [1992]; Goshorn *et al.*, Cancer Res., 53:2123-2127 [1993]; Senter *et al.* Bioconjugate Chem., 4:3-9 [1993]; DeSutter *et al.*, Mol. Immunol., 31:261-267 [1994]; Rodrigues *et al.*, Cancer Res., 55:63-70 [1995]; Svensson *et al.*, Cancer Res., 55:2357-2365 [1995]; Kerr *et al.*, Cancer Res., 55:3558-3563 [1995], y Siemers *et al.* Bioconjugate Chem., 8:510-519 [1997]).

En algunas realizaciones preferidas, los agentes son por lo menos uno seleccionado del grupo formado por agentes tiol-tiol, agentes amina-amina, agentes amina-tiol, agentes amina-ácido carboxílico, agentes tiol-ácido carboxílico y  
50 agentes de acoplamiento de éter. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce de manera no covalente. En otras realizaciones preferidas, el acoplamiento no covalente se produce a través de acoplamiento no-biotina-avidina/estreptavidina. En otros modos de realización preferidos, el acoplamiento se produce de manera hidrofóbica. En otras realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce iónicamente. En otras realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce a través de interacciones de ácido nucleico, en el que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos modificados o sin modificar. En algunas realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce sin modificar a través de interacciones de ácidos nucleicos. En otras realizaciones preferidas, las interacciones de ácido nucleico sin modificar son hibridación ARN-ADN o hibridación ADN-ADN. En otras realizaciones preferidas, el acoplamiento se produce a través de interacciones triples con ácidos nucleicos de doble cadena (*véase, por ejemplo*, Giovannangeli *et al.*, Curr. Opin. Mol. Ther., 2:288-96; Vásquez *et al.*, Trends Biochem Sci., 23:4-9 [1988]). En algunas realizaciones preferidas,  
60 el acoplamiento también se produce a través de interacciones de ácido nucleico modificado. En otras realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos modificados pueden ser PNAs (ácidos nucleicos de péptidos) en los que el azúcar-fosfodiéster se sustituye por un esqueleto peptídico (*ver*, Nielsen *et al.* Curr. Med. Chem., 8:545-50 [2001]); fosforotioatos o fosforditioatos o metilfosfonatos, en los que el fósforo de la columna de ácidos nucleicos ha sido modificado (Matteucchi, Ciba Found Symp., 209:5-14 [1997]); ácidos nucleicos basados en morfolino, en los que el azúcar-fosfodiéster ha sido sustituido por fracciones de morfolino (*ver*, Summerton, Antisense Nucl. Acid Drug Dev., 7:63-70 [1997]); ácidos nucleicos bloqueados, en los que el azúcar de la columna está "bloqueado" en una conformación más rígida para aumentar la afinidad de unión o de cualquier otro ácido nucleico modificado (*ver*, Stein *et al.*, Antisense Nucl. Acid Drug Dev., 7:151-7 [1997]). En algunas realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos modificados pueden

## ES 2 337 382 T3

ser aptámeros (ácido nucleico o moléculas basadas en péptidos que reconocen otras moléculas u objetivos) (Burgstaller *et al.* Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 5:690-700 [2002], y Crawford *et al.*, Brief Funct. Genómica Proteomic, 2:72-9 [2003]).

5 En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce a través de la detección de luz. En otras realizaciones preferidas, la detección de luz se selecciona del grupo consistente en detección de fluorescencia, fosforescencia, dispersión de luz o sus combinaciones, con o sin también la detección de diferencias en el color o la intensidad del color. En otras realizaciones preferidas, la detección se produce mediante sistemas de detección óptica sensibles a la radiación electromagnética en el intervalo de aproximadamente 400 nanómetros a aproximadamente 800 nanómetros.  
10 En algunas realizaciones preferidas, la detección se produce por la exposición de la luz a película fotográfica, CCD o detectores de tubo fotomultiplicadores. En otras realizaciones preferidas, un detector de tubo fotomultiplicador se personaliza específicamente para el rango espectral de fotones emitidos para la realización de productos.

15 En algunas realizaciones preferidas, la enzima es capaz de separar el anillo lactámico de penicilina, ampicilina, cefalosporina, y/o cualquier otra molécula que contiene un anillo betalactámico, lo que lleva a la eliminación beta y a la liberación y el destemplado de un producto fluoróforo.

20 En la presente invención, la enzima es una beta-lactamasa ("BLA"). Las enzimas BLA se encuentran ampliamente distribuidas tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. Las enzimas BLA varían en su especificidad exacta, pero todos hidrolizan  $\beta$ -lactamos, produciendo  $\beta$ -aminoácidos sustituidos. Por lo tanto, confieren resistencia a los antibióticos que contienen  $\beta$ -lactamos. Debido a que las enzimas BLA no son endógenas a los mamíferos, a diferencia de muchas proteasas, que están usualmente sólo mínimamente sujetas a interferencia de inhibidores, sustratos de enzimas y/o sistemas endógenos de enzima. Así, BLAs son particularmente adecuadas para las funciones de reportero.

25 Ejemplos de BLAs específicas que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no están limitadas a,  $\beta$ -lactamasa de clase A, B, C y/o D.

30 Tras la unión de la fracción acoplada a la enzima objetivo *in vivo*, se administra un sustrato que se puede separar fluorescente templado (*por ejemplo*, por vía parenteral), y se permitió llegar al sitio(s) de unión de la fracción objetivo en el cual el sustrato de fluorescencia templado se rompe, generando un producto detectable ópticamente que emite fotones "adherente" o localizado.

35 En algunas realizaciones preferidas, el sustrato es una molécula orgánica de estructura electrónica que no es fluorescente en proximidad de una segunda molécula orgánica unidad de manera covalente. Tras la liberación enzimática de la segunda molécula, el sustrato se convierte en un producto mediante la enzima, sufre un reordenamiento electrónico, que emite longitudes de onda que son más largas. En algunas realizaciones preferidas, el sustrato es al menos una de las moléculas indicadas en la Figura 2. En algunas realizaciones preferidas, el sustrato es un compuesto que contiene  $\beta$ -lactamo (*por ejemplo*, un antimicrobiano) que comprende un núcleo cefem sustituido en el sitio R2 con un fluoróforo que se apaga hasta que sea liberado mediante una reacción beta de eliminación tras la apertura hidrolítica del anillo lactámico (*ver* la Figura 2C; *Ver también*, Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw Hill, [1996], Tabla 45-2).

45 El componente fluorescente del conjugado antimicrobiano (*por ejemplo*, cefalosporina) comprende cualquier fluoróforo, de manera que cuando se acopla a la cefalosporina se apaga, pero está destemplado cuando se libera del antimicrobiano y se localiza en el sitio de la enzima mediante mecanismos tales como: (1) precipitación y adhesión a la superficie de la célula a la que la enzima está unida mediante la fracción de selección; (2) atracción hidrofóbica (*por ejemplo* a través de una cadena de carbonos alifáticos) que se unen a los lípidos presentes en la membrana celular sin ser internalizados; (3) ser de una naturaleza tal que se difunde a través de la membrana plasmática y, por lo tanto, se internaliza en la célula, y/o (4) ser una molécula que facilita la captación activa, tal como un transportador de aminoácidos.

55 Como los sustratos de lactamasa pueden exhibir diferentes propiedades espectrales, este sistema ofrece una flexibilidad adicional en términos de proporcionar medios para utilizar muchos colores. Como la lactamasa es una enzima, la amplificación substancial de la señal también es una propiedad importante de este sistema, que también contribuye a su unicidad.

60 En algunas realizaciones preferidas, el producto es una molécula adherente. En otras realizaciones preferidas, el producto se mantiene relativamente cerca del sitio de separación. En algunas realizaciones preferidas, el producto no se difunde más de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 diámetros de célula de distancia del sitio de separación. En realizaciones preferidas adicionales, la detección se produce relativamente cerca del sitio de separación. En otras realizaciones preferidas, la detección se produce a aproximadamente 1 a aproximadamente 5 diámetros de célula de distancia del sitio de separación.

65 En algunas realizaciones preferidas, el agente dirigido es seleccionado del grupo formado por anticuerpos o fragmentos de los mismos, péptidos, nanocuerpos, nanopartículas, ligandos de moléculas pequeñas, ligandos de receptores, proteínas que se encuentran a que se unen a objetivos (*por ejemplo*, citocinas o factores de crecimiento) y/o factores de transcripción.

En algunas realizaciones preferidas, el objetivo se selecciona del grupo consistente en una célula cancerosa, líneas celulares o cultivos celulares, extractos tumorales o de tejido canceroso, u órganos, una molécula asociada con una célula cancerosa, línea de cultivo de células o de extractos de células tumorales o tejido canceroso o un órgano, o una célula, líneas celulares o cultivos de células, tejidos u órganos asociados con una célula cancerosa; líneas celulares o cultivos celulares, extractos tumorales o de un tejido canceroso, o de órganos.

En algunas realizaciones, el objetivo es una superficie. En algunas realizaciones, la superficie es una “superficie biológica”. En realizaciones adicionales, la superficie biológica es una superficie de un órgano, mientras que en realizaciones alternativas, la superficie biológica es la superficie de una célula o un tejido. En algunas otras realizaciones, la superficie biológica es una superficie de un órgano, célula o tejido enfermo, mientras que en algunas realizaciones alternativas, la superficie biológica es una superficie de un órgano, célula o tejido normal o saludable. En otras realizaciones, la superficie es una macromolécula en el espacio intersticial de un tejido. En realizaciones adicionales, la superficie biológica es la superficie de un microorganismo, incluyendo pero no limitado a bacterias, hongos, virus, parásitos (helminths, protozoos, etc.). En algunas realizaciones, el microorganismo es un patógeno animal, mientras que en otras realizaciones, el microorganismo no es patógeno para los humanos y/u otros animales. Las fuentes de células y/o tejidos incluyen humanos, animales no humanos, bacterias, hongos y plantas.

En algunas realizaciones preferidas, el objetivo es un “objetivo relacionado con el cáncer”. El término incluye cualquier objetivo al que una composición de la invención se une como parte del diagnóstico o la detección de un cáncer o condición asociada al cáncer en un organismo. Por ejemplo, el término incluye células, tejidos y/u órganos cancerosos; moléculas asociadas con las células, tejidos u órganos cancerosos, y/o moléculas, células, tejidos u órganos que se asocian células, tejidos u órganos cancerosos (*por ejemplo*, una molécula de diagnóstico unida a un tumor administrada a un sujeto), así como muestras de biopsia tomadas de un sujeto, o de un tejido sano (*por ejemplo*, la vasculatura que se asocia con los tejidos cancerosos). Ejemplos de objetivos relacionados con el cáncer se proporcionan en la patente US 6.261.535. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a ningún objetivo específico relacionado con el cáncer. El objetivo relacionado con el cáncer puede estar relacionado con cualquier cáncer o condición asociada al cáncer. Ejemplos de tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas, y cánceres de tipo mixto.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de hueso. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a sarcoma de Ewing, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma y otros sarcomas de tejidos blandos. En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer neurológico, incluyendo pero no limitado a tumores cerebrales, oligodendrogliomas, meningiomas, linfomas, schwannomas y meduloblastomas. En realizaciones adicionales, el cáncer es cáncer de mama (*por ejemplo*, carcinoma ductal *in situ* en el pecho). En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de próstata. En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer del sistema endocrino (*por ejemplo*, suprarrenales, páncreas, paratiroides, pituitaria y tiroides). En realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer gastrointestinal, (*por ejemplo*, anal, colon y recto, rectal, oral, lingual, esófago, estómago, vesícula biliar, estómago, hígado, páncreas, cáncer de intestino grueso, e intestino delgado). En realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer ginecológico (*por ejemplo*, cervical, endometrio, útero, falopial, enfermedad trofoblástica gestacional, coriocarcinoma, cáncer de ovario, vulva y vagina). En realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello (*por ejemplo*, de laringe, orofaringe, paratiroides y tiroides). En realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer leucémico (*por ejemplo*, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas y/o un trastorno mieloproliferativo). En realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer de pulmón (*por ejemplo*, mesotelioma, cáncer microcítico de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas). En realizaciones adicionales, el cáncer es un linfoma (*por ejemplo*, un linfoma relacionado con el SIDA, linfoma cutáneo de células, linfoma de células B, micosis fungoide, enfermedad de Hodgkin y enfermedad de no Hodgkin). En otras realizaciones, el cáncer es un mieloma (*por ejemplo*, mieloma múltiple). En otras realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer pediátrico (*por ejemplo*, tumor cerebral, sarcoma de Ewing, leucemia (*por ejemplo*, leucemia linfocítica aguda o leucemia mielóide aguda), cáncer de hígado, linfoma (*por ejemplo*, linfoma de Hodgkin o linfoma no de Hodgkin), neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma (*por ejemplo*, osteosarcoma y rhabdomyosarcoma), y tumor de Wilms. En realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer del sistema reproductor masculino, incluyendo pero no limitado a próstata, testículo, epidídimo, y el cáncer de pene. En realizaciones adicionales, el cáncer es un cáncer de piel (*por ejemplo*, linfoma cutáneo de células T, micosis fungoide, sarcoma de Kaposi, subcutáneo o melanoma). En realizaciones adicionales, el cáncer es cáncer de tiroides (*por ejemplo*, papilar, folicular, medular o anaplásico o carcinoma indiferenciado de tiroides). En realizaciones adicionales, el cáncer es cáncer del tracto urinario (*por ejemplo*, vejiga, riñón y uretra). En realizaciones adicionales, el cáncer o condición relacionada con el cáncer es ataxia-telangiectasia, carcinoma de origen desconocido, síndrome de Li-Fraumeni o timoma. En realizaciones adicionales, el cáncer es cáncer metastásico.

En realizaciones adicionales, el objetivo relacionado con el cáncer es una molécula asociada con una célula o tejido canceroso. En algunas realizaciones, la molécula es un tumor o antígeno de vasculatura/estroma tumoral, por ejemplo, CD20, CD19, CD30, CD3, GD2, Lewis-Y, 72 glicoproteína KD (gp72, factor de deterioro acelerado, CD55, DAF, C3/convertasas C5), CO17-1A (EpCAM, 17-1A, LE-40), TAG-72, GASC-P (CSAP), 45kd glicoproteína, HT-29 AG, NG2, A33 (43kd gp), 38kd gp, MUC-1, CEA, EGFR (HER1), HER2, HER3 HER4, ligando HN-1, CA125, sindecano-1, Lewis X, estroma FAP Ag (proteína de activación de fibroblastos), receptores EDG (receptores de endoglina), ED-B, laminina-5 (gamma2), COX-2 (+ LN-5), PGP (P-glicoproteína), integrina alfaVbeta3, integrina alfaVbeta5, uPAR (activador del receptor plasminógeno uroquinasa), endoglina (CD105), GD2, aminopeptidasa, tenascina-C, NG-2, TEM1, TEM8, anexina, osteopontina receptora de folato (EDG 1,3), p97 (melanotransferrina), farnesil transferasa o una molécula en una vía apoptótica (*por ejemplo*, receptor de muerte, fas, caspasa o bcl-2) o una lectina.

Debido a la amplificación enzimática de reactivo de detección, los antígenos que se expresan en niveles muy bajos pueden detectarse mediante los procedimientos de la presente invención. La sensibilidad de detección es un reflejo del número de moléculas reporteras que se han unido a un antígeno objetivo a través de los procedimientos de la presente invención. Así, cuanto mayor sea el número de moléculas reporteras presentes, mayor es la señal y mayor es la sensibilidad del procedimiento. Por lo tanto, la unión de una enzima que genera miles de moléculas reporteras aumenta la sensibilidad del procedimiento. La generación enzimática de reporteros múltiples ayuda a superar la estequiometría de la fracción de unión (*es decir*, 1:1, asumiendo que haya un epítopo de un agente de unión específico).

En realizaciones adicionales, el objetivo es una célula de sangre, incluyendo células hematopoyéticas (*por ejemplo*, células madre hematopoyéticas, así como las distintas células inmaduras en las líneas eritrocíticas, trombocíticas, y leucocíticas. “Células sanguíneas” incluyen pero no están limitados a células hematopoyéticas, eritrocitos, neutrófilos, monocitos, plaquetas, mastocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, células B, células T, células plasmáticas, mastocitos, macrófagos y células asesinas naturales. En algunas realizaciones, el objetivo es una célula de sangre anormal. En algunas realizaciones, los objetivos HSC tienen un perfil de expresión de antígeno de superficie CD34<sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup> o CD34<sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> (“Lin<sup>-</sup>” se refiere a una población de células seleccionadas sobre la base de la falta de expresión de al menos un marcador específico de la línea). Procedimientos de aislamiento y selección de CMH son bien conocidos en la técnica (*véase por ejemplo*, las patentes US 5.061.620, 5.677.136, y 5.750.397).

En otras realizaciones, el objetivo es una molécula. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula orgánica. En realizaciones adicionales, la molécula es una molécula biológica. En realizaciones adicionales, la molécula biológica es una molécula asociada a células. En realizaciones adicionales, la molécula asociada a células está asociada con la superficie exterior de una célula. En algunas realizaciones, la molécula asociada a células es parte de la matriz extracelular. En algunas realizaciones adicionales, la molécula asociada a células es una proteína. En algunas realizaciones, la proteína es un receptor. En realizaciones adicionales, la molécula asociada a células es específica para un determinado tipo celular. En realizaciones adicionales, la célula es una célula enferma y/o anormal. En algunas realizaciones preferidas, la célula es una célula enferma de cáncer. En otra realización, la célula enferma es una célula infectada. Moléculas adicionales que encuentran uso como objetivos en la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y polisacáridos, glicoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, sustancias tóxicas, metabolitos, inhibidores, fármacos, tintes, nutrientes y factores de crecimiento.

Ejemplos no limitativos de proteínas y objetivos químicos comprendidos en la presente invención incluyen citocinas y quimiocinas y sus receptores. El término “citocinas”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquiera de los numerosos factores que ejercen una gran variedad de efectos sobre las células (*por ejemplo*, inducir crecimiento, diferenciación y/o proliferación). Ejemplos no limitativos incluyen interleucinas (IL), tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14 e IL-16, receptor IL-2 soluble, receptor IL-6 soluble; eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor de células madre (SCF), factor inhibidor de leucemia (LIF); interferones (*por ejemplo*, IFN-alfa, -beta y -gamma); oncostatina M (OM), la superfamilia de las inmunoglobulinas, familia de factor de necrosis tumoral (TNF), en particular, TNF- $\alpha$ , transformación de los factores de crecimiento, (*por ejemplo*, TGF-alfa y TGF-beta), y IL-1 $\alpha$ , y familia del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), en particular, VEGF (también conocido en la técnica como VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PlGF). Las citocinas están comercialmente disponibles por parte de varios fabricantes incluyendo Amgen (Thousand Oaks, CA), Immunex (Seattle, WA) y Genentech (South San Francisco, CA). En algunas realizaciones, los objetivos particularmente preferidos son VEGF y TNF- $\alpha$ .

Anticuerpos contra TNF- $\alpha$  muestran que la interacción de bloqueo de la TNF- $\alpha$  con su receptor es útil en la modulación de la sobreexpresión de TNF- $\alpha$  de varias enfermedades tal como shock séptico, artritis reumatoide y otros procesos inflamatorios. El VEGF es un inductor angiogénico, un mediador de la permeabilidad vascular y un mitógeno específico de las células endoteliales. El VEGF también ha estado implicado en tumores. Se ha previsto que los miembros de la familia de orientación del VEGF y/o sus receptores tendrán importantes aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, se contempla que el bloqueo de VEGF Htat tendrá valor terapéutico en el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) (*véase por ejemplo*, Ferrara *et al.*, Nat. Med., 5:1359 [1999]), y Gerber *et al.* Nat. Med., 5:623 [1999]). Otros objetivos preferidos son receptores de superficie celular, tales como receptores de células T.

Las “quimiocinas” son una familia de pequeñas proteínas que desempeñan un papel importante en el tráfico celular y la inflamación. Los miembros de la familia de las quimiocinas incluyen, pero no se limitan a, IL-8, factor-1 derivado estomacal (SDF-1), factor plaquetario 4, proteína-2 activadora de neutrófilos (PAN-2) y proteína-1 quimio atrayente de monocitos (MCP-1). Estas proteínas también encuentran uso como objetivos en los procedimientos de la presente invención.

Otras proteínas y objetivos químicos incluyen, pero no están limitados a: modulación de proteínas de inmunorregulación, tal como antígeno leucocitario humano soluble (HLA, clase I o clase II, y clase I no clásica HLA (E, F y G)); proteínas de superficie, tales como proteínas de la superficie de células T o B solubles, albúmina sérica humana; metabolitos de ácido aracádónico, tal como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano y prostaciclina, IgE, auto o aloanticuerpos de autoinmunidad o alo- o xenoinmunidad; receptores Ig Fc o factores de unión de receptores Fc; receptores acoplados a proteínas G, hidratos de carbono de la superficie celular, factores de angiogénesis, moléculas de adhesión; iones tales como calcio, potasio, magnesio, aluminio y hierro, proteínas de fibrillas, tales como priones y tubulina, enzimas tales como proteasas, aminopeptidasas, quinasas, fosfatasas, ADNAsas, ARNAsas, lipasas, esterases,

deshidrogenasas, oxidasas, hidrolasas, sulfatasas, ciclasas, transferasas, transaminasas carboxilasas, descarboxilasas, superóxido dismutasa y sus sustratos naturales o análogos, hormonas y sus receptores correspondientes, tales como hormona estimulante de folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), tiroxina (T4 y T3), apolipoproteínas, lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), cortisol, aldosterona, estriol, estradiol, progesterona, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHBA) y su sulfato (DHEA-S), hormonas peptídicas, tal como renina, insulina, calcitonina, hormona paratiroidea (PTH), hormona de crecimiento humana (hGH), vasopresina y hormona antidiurética (AD), prolactina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), LHRH, hormona liberadora de tiotropina (THRH), péptido intestinal vasoactivo (VIP), bradicinina y prohormonas correspondientes; catecholaminas tales como adrenalina y metabolitos; cofactores incluyendo el factor atrionatriótico (ADF), vitaminas A, B, C, D, E y K y serotonina; factores de coagulación, tales como protrombina, trombina, fibrina, fibrinógeno, factor VIII, factor IX, XI y Factor von Willebrand, factores de plasminógeno, tal como plasmina, activación de factores de complemento, LDL y de sus ligandos y ácido úrico, compuestos que regulan la coagulación, tales como hirudina, hirulogo, hementina, heparina y plasminógeno activador tisular (APT), ácidos nucleicos para terapia génica, antagonistas de enzimas, compuestos que se unen a ligandos, tales como factores de la inflamación y receptores y otras proteínas que se unen a una o más de las anteriores moléculas.

Objetivos químicos adicionales incluyen, sin limitación, drogas, especialmente las drogas objeto de abuso, tal como cannabis, heroína y otros opiáceos, fenciclidina (PCP), barbitúricos, cocaína y sus derivados y benzodiacepina; toxinas, tales como metales pesados como mercurio y plomo, arsénico y el compuestos radiactivos, agentes quimioterapéuticos, tales como paracetamol, digoxina y radicales libres, toxinas bacterianas, tal como lipopolisacárido (LPS) y otras toxinas gram negativas, toxinas *Staphylococcus*, toxina A, toxinas del tétanos, toxina de la difteria, toxinas de tosferina, toxinas de plantas y marinas, venenos de serpiente y otros factores de virulencia, tales como aerobactinas, toxinas, proteínas, etc.; virus infecciosos, tal como hepatitis, citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple (*por ejemplo*, VHS tipos 1, 2 y 6), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de varicela-zoster (VVZ), virus de inmunodeficiencia humana (*por ejemplo*, VIH-1, -2) y otros retrovirus, adenovirus, rotavirus, influenza, rinovirus, parvovirus, rubéola, virus del sarampión, poliomiéltis, paramixovirus, papovavirus, poxvirus, arbovirus, flavivirus, arenavirus, virus de la rabia, calicivirus, astrovirus, rotavirus, y picomavirus; priones; factor tisular de plasmodios, protozoos, incluyendo amebas (*por ejemplo*, *Entamoeba histolytica*), filarias (*por ejemplo*, *Wuchereria*), *Plasmodium*, *Giaidia*, *Leishmania*, *Cryptosporidium*, *Sarcocystis*, *Babesia*, *Trypanosoma*, y *Toxoplasma*; helmintos (*por ejemplo*, trematodos, cestodos y nematodos), bacterias, incluidas bacterias aeróbicas, anaeróbicas y facultativas responsables de la sepsis nosocomial y otras infecciones (*por ejemplo*, *E. coli*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *aureus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, Micobacterias, *Legionella*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Treponema*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Bartonella*, etc.) y hongos (*por ejemplo*, *Candida*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus*, *Trichosporum*, *Microsporium*, *Pichnia*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, etc.). De hecho, no es la intención que la presente invención se limite a ningún objetivo concreto, de manera cualquier objetivo que se pueda unir (*es decir*, para formar un objetivo de unión) se emplea en la presente invención).

En realizaciones adicionales, el objetivo es una planta o material de origen vegetal. En algunas realizaciones, el objetivo es madera, mientras que en otras realizaciones, el objetivo es una planta leñosa. Se pretende que la presente invención abarque cualquier planta y/o material de origen vegetal.

En algunas realizaciones, el objetivo es una enzima tal como proteasas, aminopeptidasas, quinasas, fosfatasas, ADNasas, ARNasas, lipasas, esterasas, deshidrogenasas, oxidasas, hidrolasas, sulfatasas, celulasas, ciclasas, transferasas, transaminasas, carboxilasas, descarboxilasas, superóxido dismutasa, y sus sustratos naturales o análogos. Las enzimas particularmente preferidas incluyen hidrolasas, en particular alfa/beta hidrolasas, proteasas de serina, tales como subtilisinas, y quimotripsina serina proteasas, celulasas y lipasas.

En realizaciones adicionales, la superficie es una superficie no biológica. En algunas realizaciones, la superficie no biológica es una superficie de un dispositivo médico. En otras realizaciones, el dispositivo médico es un dispositivo terapéutico. Sin embargo, en otras realizaciones, el dispositivo terapéutico es un dispositivo terapéutico implantado. En realizaciones adicionales, el dispositivo médico es un dispositivo de diagnóstico. En algunas realizaciones, el dispositivo de diagnóstico es un pozo o una bandeja.

En otras realizaciones, el objetivo es un material no biológico. En algunas realizaciones, el material no biológico es un tejido. En algunas realizaciones preferidas, el tejido es un tejido natural. En realizaciones adicionales, el tejido es algodón, seda o lana. En realizaciones adicionales, el tejido es un tejido no natural. En algunas realizaciones, el tejido es nylon, rayón y/o poliéster. En algunas realizaciones, el tejido es una mezcla de fibras naturales y/o sintéticas. En otras realizaciones, el material no biológico es plástico, cerámica, metal, y/o caucho. En realizaciones adicionales, el material es un material compuesto a partir de cualquiera de los anteriores.

En realizaciones adicionales, el objetivo es un microcircuito. Este circuito puede estar en su forma acabada o en cualquier etapa de la fabricación de circuitos. El agente dirigido puede ser utilizado para retirar o depositar un compuesto en el circuito, por ejemplo, un dopante tipo n (*por ejemplo*, arsénico, fósforo, antimonio, titanio u otras especies donadoras de átomos) o un dopante tipo p (*por ejemplo*, boro, aluminio, galio, indio u otras especies receptoras de átomos) (*véase, por ejemplo*, Van Zant, *Microchip Fabrication*, McGraw-Hill, Nueva York, [2000]).

De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún objetivo concreto, ya que cualquier objetivo que se pueda unir (*es decir*, para formar un objetivo de unión) encuentra uso en la presente invención).

## ES 2 337 382 T3

En una realización preferida, el procedimiento comprende la etapa adicional de analizar los resultados obtenidos después de que el sustrato se haya añadido al sistema de ensayo. Este análisis se puede hacer utilizando cualquier procedimiento apropiado, incluyendo pero no limitado a un sistema de lectura que comprende un ordenador (*por ejemplo*, basados en un PC u otro con RAM suficiente (> 250 MB), y una tarjeta de vídeo) y software (cualquier programa de análisis de imagen disponible comercialmente, *por ejemplo* ImagePro, Metamorph), película fotográfica (cualquier película de color estándar de ASA apropiado) u otros medios (*por ejemplo*, sistemas de imágenes basados en PMT, sistemas basados en fotodiodos) para la generación de imágenes y/o datos numéricos de los fotones emitidos. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún procedimiento de análisis en particular.

### 10 Experimental

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar algunas formas de realización preferidas y aspectos de la presente invención y no debe interpretarse como una limitación de su alcance.

En la descripción experimental a continuación, se aplican las siguientes abreviaturas: sd y SD (desviación estándar), M (molar); mM (milimolar);  $\mu$ M (micromolar); nM (nanomolar), mol (moles); mmol (milimoles); mol (micromoles), nmol (nanomoles), g (gramos), mg (miligramos);  $\mu$ g (microgramos), pg (picogramos), L (litros); ml (mililitros);  $\mu$ l (microlitros), cm (centímetros); milímetros (mm);  $\mu$ m (micrómetros); nm (nanómetros); °C (grados centígrados); ADNc (copia o ADN complementario); ADN (ácido desoxirribonucleico); ADNss (ADN de cadena simple); ADNds (AND de doble cadena); dNTP (desoxirribonucleótido trifosfato), ARN (ácido ribonucleico), PBS (tampón fosfato salino), g (gravedad), OD (densidad óptica); CPM y CPM (cuentas por minuto); rpm (revoluciones por minuto), solución amortiguadora de fosfato de Dulbecco (DPBS); HEPES (N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N-[2-etano-sulfónico]); HBS (solución salina tampón HEPES), SDS (dodecilsulfato sódico), Tris-HCl (Tris [hidroximetil]-aminometano-hidrocloruro), B-PER (reactivo de extracción de la proteína bacteriana, Pierce), 2-ME (2-mercaptoetanol); EGTA (glicol de etileno-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) N, N, N', N'-tetraacético), EDTA (ácido etilenediamine-tetracético); bla ( $\beta$ -lactamasa o gen con resistencia a la ampicilina); Aptagen (Herndon, VA); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Takara (Takara Bio Inc., Shiga, Japón); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY); Oxoid (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra), Pierce (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL), Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); Invitrogen (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA); Polysciences (Polysciences, Inc., Warrington, PA); Dako (DakoCytomation, Inc., Carpinteria, CA); Cemicon (Cemicon Internacional, Temecula CA); Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), Hamamatsu (Hamamatsu, Corp., Hamamatsu, Japón); Ardaís (Ardaís Inc., Lexington, MA), Kodak (Eastman Kodak, Rochester, NY), Omega (Omega Optical Inc., Brattleboro, Vermont), y Molecular DEvices (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### 35 Ejemplo 1

##### *Construcción de la molécula CAB 1,2*

En este ejemplo, se describe la construcción de CAB 1.2. Plásmido pME27.1 fue generado mediante la inserción de un fragmento *BGLI-EcoRV* que codifica una parte del líder pelB, el Cab1-scFv y una pequeña parte de BLA en el vector de expresión pME25. La Figura 12A proporciona un mapa de este plásmido. El inserto que codifica Cab1-scFv fue sintetizada mediante Aptagen, basado en la secuencia de FME scFv-23 (*ver*, Boehm *et al.*, Biochem. J., 346 (Pt 2): 519-528 [2000]). Tanto el plásmido que contiene el gen sintético (pPCR-GME1) como pME25 fueron digeridos con *BGLI* y *EcoRV*, purificados con gel, y ligados con ligasa Takara. Los productos de ligación se transformaron en células electrocompetentes TOP10 (Invitrogen), y se colocaron en placas en medio LA que contiene 5 mg/l de cloranfenicol y 0,1 mg/l de cefotaxima. El plásmido pME27.1 contenía los siguientes componentes.

Componentes del Plásmido pME27.1	
LAC P	4992-5113 pb
líder B pel	13-78 pb
CAB 1 scFv	79-810 pb
BLA	811-1896 pb
Plazo T7.	2076-2122 pb
CAT	3253-3912 pb

## ES 2 337 382 T3

Tal como se indicó anteriormente, un mapa del plásmido pME27.1 se proporciona en la figura 12A. La figura 12B proporciona la secuencia CAB1, incluyendo las secuencias de los dominios de cadena pesada (SEQ ID NO: 3) y luz (SEQ ID NO: 4), así como la secuencia de enlace (SEQ ID NO: 5), y la secuencia BLA (SEQ ID NO: 6).

5

### Selección de mutaciones para la mutagénesis

La secuencia de las secuencias vH y vL de CAB1-scFv se comparó con un análisis de frecuencia publicado de anticuerpos humanos (*ver*, Steipe, Sequenzdatenanalyse, (Secuencia de análisis de datos, disponible sólo en alemán) *en Zorbas and Lottspeich, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, S. 233-241 [1998]* preparado mediante la alineación de secuencias de segmentos variables de anticuerpos humanos encontrados en la base de datos Kabat, y mediante el cálculo de la frecuencia de aparición de cada aminoácido para cada posición. Estas comparaciones se presentan en la Figura 13. Específicamente, la Figura 13A muestra una comparación de las frecuencias observadas de los cinco aminoácidos más abundantes en la alineación de secuencias humanas en la cadena pesada, mientras que la figura 13 B muestra una comparación de las frecuencias observadas de los cinco aminoácidos más abundantes en secuencias de cadena ligera humanas.

Estas frecuencias se compararon con la secuencia de aminoácidos real de CAB1 y se identificaron 33 posiciones que cumplieron los siguientes criterios: la posición no es parte de un CDR, tal como se define en la nomenclatura Kabat; el aminoácido encontrado en CAB1-scFv se observa en la posición homóloga en menos del 10% de los anticuerpos humanos, y la posición no es uno de los últimos 6 aminoácidos en la cadena ligera de scFv. Las 33 posiciones resultantes fueron elegidas para mutagénesis combinatoria realizada tal como se describe a continuación.

Los oligonucleótidos mutagénicos fueron sintetizados para cada una de las 33 posiciones, de tal manera que la posición específica se puede cambiar desde el aminoácido en CAB1-scFv al aminoácido más abundante en la posición homóloga de un anticuerpo humano. La Figura 12B muestra la secuencia de CAB1-scFv, los CDR y las mutaciones que fueron elegidos para la mutagénesis combinatoria.

### 30 Construcción de la Librería NA05

La tabla 1 proporciona las secuencias de 33 oligonucleótidos mutagénicos que se utilizaron para generar la librería combinatoria NA05:

35

Tabla 1. Oligonucleótidos Usados para Generar Librería NA05					
pos. (pME27)	MFE-23	consensus aa (VH)	cuenta de residuos a cambiar	Cebador Múltiple QuickChange	SEQ ID NO:
3	K	Q	nsa147.1fp	CGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGC	SEQ ID NO:7
13	R	K	nsa147.2fp	CTGGGGCAGAACTTGTGAAATCAGGGACCTCAGTCAA	SEQ ID NO:8
14	S	P	nsa147.3fp	GGGCAGAACTTGTGAGGCCGGGACCTCAGTCAAGTT	SEQ ID NO:9
16	T	G	nsa147.4fp	AACTTGTGAGGTCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCCTG	SEQ ID NO:10
28	N	T	nsa147.5fp	GCACAGCTTCTGGCTTACCATTAAAGACTCCTATAT	SEQ ID NO:11
29	I	F	nsa147.6fp	CAGCTTCTGGCTTCAACTTTAAAGACTCCTATATGCA	SEQ ID NO:12
30	K	S	nsa147.7fp	CTTCTGGCTTCAACATTAGCGACTCCTATATGCACTG	SEQ ID NO:13

60

65

## ES 2 337 382 T3

37	L	V	nsa147.8fp	ACTCCTATATGCACTGGGTGAGGCAGGGGCCTGAACA	SEQ ID NO:14
40	G	A	nsa147.9fp	TGCACTGGTTGAGGCAGGGCCCTGAACAGGGCCTGGGA	SEQ ID NO:15
42	E	G	nsa147.10fp	GGTTGAGGCAGGGCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGAT	SEQ ID NO:16
67	K	R	nsa147.11fp	CCCCGAAGTTCCAGGGCCGTGCCACTTTTACTACAGA	SEQ ID NO:17
68	A	F	nsa147.12fp	CGAAGTTCAGGGCAAGTTCACTTTTACTACAGACAC	SEQ ID NO:18
70	F	I	nsa147.13fp	TCCAGGGCAAGGCCACTATTACTACAGACACATCCTC	SEQ ID NO:19
72	T	R	nsa147.14fp	GCAAGGCCACTTTTACTCGCGACACATCCTCCAACAC	SEQ ID NO:20
76	S	K	nsa147.15fp	TTACTACAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTGCA	SEQ ID NO:21
97	N	A	nsa147.16fp	CTGCCGTCTATTATTGTGCGGAGGGGACTCCGACTGG	SEQ ID NO:22
98	E	R	nsa147.17fp	CCGTCTATTATTGTAATCGCGGGACTCCGACTGGGCC	SEQ ID NO:23
136	E	Q	nsa147.18fp	CTGGCGGTGGCGGATCACAGAATGTGCTCACCCAGTC	SEQ ID NO:24
137	N	S	nsa147.19fp	GCGGTGGCGGATCAGAAAGCGTGCTCACCCAGTCTCC	SEQ ID NO:25
142	S	P	nsa147.20fp	GAAAATGTGCTCACCCAGCCGCCAGCAATCATGTCTGC	SEQ ID NO:26
144	A	S	nsa147.21fp	TGCTCACCCAGTCTCCAAGCATCATGTCTGCATCTCC	SEQ ID NO:27
146	M	V	nsa147.22fp	CCCAGTCTCCAGCAATCGTGTCTGCATCTCCAGGGGA	SEQ ID NO:28
152	E	Q	nsa147.23fp	TGTCTGCATCTCCAGGGCAGAAGGTCACCATAACCTG	SEQ ID NO:28
153	K	T	nsa147.24fp	CTGCATCTCCAGGGGAGACCGTCACCATAACCTGCAG	SEQ ID NO:30
170	F	Y	nsa147.25fp	TAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAC	SEQ ID NO:31
181	W	V	nsa147.26fp	GCACTTCTCCAAACTCGTGATTTATAGCACATCCAA	SEQ ID NO:32
194	A	D	nsa147.27fp	TGGCTTCTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAGTGG	SEQ ID NO:33
200	G	K	nsa147.28fp	CTCGCTTCAGTGGCAGTAAATCTGGGACCTCTTACTC	SEQ ID NO:34
205	Y	A	nsa147.29fp	GTGGATCTGGGACCTCTGCGTCTCTACAATCAGCCG	SEQ ID NO:35
212	M	L	nsa147.30fp	CTCTACAATCAGCCGACTGGAGGCTGAAGATGCTGC	SEQ ID NO:36
217	A	E	nsa147.31fp	GAATGGAGGCTGAAGATGAAGCCACTTATTACTGCCA	SEQ ID NO:37
219	T	D	nsa147.32fp	AGGCTGAAGATGCTGCCGATTATTACTGCCAGCAAAG	SEQ ID NO:38
234	A	G	nsa147.33fp	ACCCACTCACGTTCCGTGGCGGCACCAAGCTGGAGCT	SEQ ID NO:39

El equipo de mutagénesis dirigido a múltiples sitios QuikChange (QCMS; Stratagene) se utilizó para construir la librería combinatoria NA05 usando los anteriores 33 cebadores mutagénicos. Los cebadores fueron diseñados de modo que había 17 bases de flaqueo a cada lado del codón de interés basado en la plantilla de plásmido pME27.1. El codón de interés se cambió para codificar el aminoácido de consenso adecuado mediante una tabla de uso de codones *E coli*. Todos los cebadores se diseñaron para templar la misma cadena de la plantilla de ADN (*es decir*, todos fueron cebadores delanteros en este caso). La reacción QCMS se llevó a cabo tal como se describe en el manual QCMS con la excepción de la concentración del cebador utilizado; el manual QCMS recomienda el uso de 50 ng de cada cebador en la reacción, mientras que, en estos experimentos, se utilizaron 3 ng de cada cebador (por lo tanto, otras cantidades de cebador encuentran uso). En particular, la reacción contenía 50-100 ng de plantilla de plásmido (pME27.1; 5178bp), 1  $\mu$ l de mezcla de cebadores (stock de 10  $\mu$ M de todos los cebadores combinado con 0,3  $\mu$ M de cada cebador), 1  $\mu$ l dNTPs (equipo QCMS), 2,5  $\mu$ l 10x de tampón de reacción QCMS, 18,5  $\mu$ l de agua desionizada y 1  $\mu$ l de mezcla de enzimas (equipo QCMS) para un volumen total de 25 microlitros. El programa de termociclo utilizado fue: 1 ciclo a 95°C durante 1 min., seguido de 30 ciclos de 95°C durante 1 min., 55°C durante 1 min. y 65°C durante 10 minutos. La digestión de *DPNI*, se realizó añadiendo 1  $\mu$ l de *DPNI* (incluida en el equipo QCMS), incubación a 37°C durante 2 horas, además de otro 1  $\mu$ l de *DPNI*, e incubación a 37°C durante 2 horas. Entonces, 1  $\mu$ l de la reacción se transformó en 50  $\mu$ l de células TOP10 electrocompetentes (Invitrogen). Luego, 250 ml de SOC fueron añadidos después de la electroporación, seguido por una hora de incubación con agitación, a 37°C. Después de este período de incubación, 10-50  $\mu$ l de la mezcla de transformación se depositaron en placas que contenían 5 ppm de cloranfenicol (CMP) o placas LA que contenían 5ppm de CMP y 0,1 ppm de cefotaxima (CTX) para la selección de los clones BLA activos. Los clones BLA activos de las placas CMP + CTX fueron utilizados para la detección, mientras que los clones de la librería aleatoria de las placas CMP fueron secuenciados para evaluar la calidad de la librería.

Dieciséis clones seleccionados al azar fueron secuenciados. Estos clones se encontraron que contenían diferentes combinaciones de 1 a 7 mutaciones.

## ES 2 337 382 T3

### *Cribado para expresión mejorada*

Al cultivar TOP10/pME27 en medio LB a 37°C, se encontró que la concentración de proteína de fusión intacto alcanzó el máximo después de un día y la mayor parte de la proteína de fusión fue degradada mediante proteasas huésped después de 3 días de cultivo. La degradación se produjo sobre todo en la porción scFv de la proteína de fusión CAB1, ya que los cultivos contenían cantidades significativas de BLA libre después de 3 días, que puede ser detectada mediante Western blot, o ensayo de actividad de nitrocefina (Oxoid). Así, un cribado aplicado a la librería NA05 fue capaz de detectar variantes de CAB1-scFv que resisten la degradación por proteasas huésped durante 3 días de cultivo a 37°C.

La librería NA05 se colocó en placas agar con medio LA que contenía 5 mg/l de cloranfenicol y 0,1 mg/l de cefotaxima (Sigma): Después de la incubación, 910 colonias fueron transferidas a un total de 10 placas de 96 pocillos con 100 ul/pocillo de medio LA que contenía 5 mg/l de cloranfenicol y 0,1 mg/l de cefotaxima. Cuatro pocillos en cada placa fueron inoculados con TOP10/pME27.1 como control y un pocillo por placa se dejó en blanco. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37°C. Al día siguiente, los cultivos se utilizaron para inocular las placas frescas (placas de producción) con 100 ul del mismo medio utilizando un instrumento de transferencia de estampado. Se añadió glicerol a las placas maestras, que estaban almacenadas a -70°C. La producción de placas se incubó en un agitador humidificado a 37°C durante 3 días. Tras la incubación, se agregaron 100 ul de B-PER (Pierce) en cada pocillo de la placa de producción para la liberación de las proteínas de las células. La placa de producción se diluyó 100 veces en PBST (PBS que contenía 0,125% de Tween®-20) y se midió la actividad BLA mediante la transferencia de 20 ul de lisado diluido en 180 ul de tampón de ensayo de nitrocefina (0,1 mg/ml de nitrocefina en 50 mM de tampón PBS que contiene 0,125% de octilglucopiranosuro (Sigma)) y se determinó la actividad BLA a 490 nm utilizando un lector de placas Spectramax plus (Molecular Devices).

Se midió la unión a CEA (Biodesign Intl. Saco, Maine) mediante el siguiente procedimiento: placas de 96 pocillos se recubrieron con 100 ul por pocillo de 5 ug/ml de CEA en 50 mM de tampón de carbonato pH 9,6 durante la noche. Las placas fueron lavadas con PBST y bloqueadas durante 1-2 horas con 300 ul de caseína (Pierce). Entonces, 100 ul de la muestra de la placa de producción diluida 100-1000 veces se añadieron a la placa recubierta con CEA y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron cuatro veces con PBST y se añadieron 200 ul de tampón de ensayo de nitrocefina, y se midió la actividad BLA tal como se describe anteriormente.

La actividad BLA que fue determinada mediante el ensayo de unión CEA y la actividad BLA total encontrada en las placas de lisado fueron comparadas y se identificaron variantes que mostraron altos niveles de actividad total de BLA y altos niveles de actividades de unión CEA.

Los ganadores fueron confirmados en 4 repeticiones, utilizando un protocolo similar: los ganadores fueron cultivados en 2 ml de LB que contenían 5 mg/l de cloranfenicol y 0,1 mg/l de cefotaxima durante 3 días. La proteína fue liberada de las células usando un reactivo B-PER. El ensayo de unión se realizó tal como se describe anteriormente, pero fueron analizadas diferentes diluciones de lisado del cultivo para cada variante. La Figura 14A proporciona curvas de unión que se obtienen de estos resultados. Los sobrenadantes de cultivo también se analizaron mediante SDS-PAGE, tal como se muestra en la Figura 14B, que proporciona fotografías de un gel que contiene 7 variantes de NA05. En esta figura, la banda de proteína de fusión se etiqueta para la variante NA05.6. La tabla 2 ofrece una clasificación de 6 variantes. Los datos se normalizaron y se calculó un índice de rendimiento. Los datos muestran claramente que NA05.6 produce cantidades significativamente mayores de la proteína de fusión comparado con la construcción de fusión pME27.1.

Tabla 2. Secuencia de seis variantes con mayor mejora en la estabilidad de

Clon	Mutaciones de CAB1
NA05.6	R13K, T16G, W181V
NA05.8	R13K, F170Y, A234G
NA05.9	K3Q, S14P, L37V, E42G, E136Q, M146V, W181V, A234G
NA05.10	K3Q, L37V, P170Y, W181V
NA05.12	K3Q, S14P, L37V, M146V
NA05.15	M146V, F170Y, A194D

## ES 2 337 382 T3

### Construcción de la Librería NA06

El clon NA05.6 (designado un CAB1.1) fue elegido como la mejor variante, y se utilizó como modelo para una segunda ronda de clon de mutagénesis combinatoria. Un subconjunto de los mismos cebadores mutagénicos utilizados para generar la librería NA05 se utilizan para generar variantes combinatorias de NA05.6 con las siguientes mutaciones: K3Q, L37V, E42G, E136Q, M146V, F170Y, A194D, A234G. Las mutaciones fueron identificadas en los otros ganadores de la librería NA05. La mutación de codificación de cebadores S14P no fue utilizada, ya que su secuencia se superponía con las mutaciones R13K y T16G presente en NA05.6 (CAB1.1). Una librería combinatoria se construyó utilizando el equipo QuikChange Multisite tal como se describe anteriormente y fue denominado "NA06." La plantilla fue pNA05.6 y 1  $\mu$ l de mezcla de cebadores (stock de 10  $\mu$ M de todos los cebadores combinados que contienen 1,25  $\mu$ M de cada cebador) se utilizaron para producir la librería utilizando los mismos procedimientos descritos anteriormente.

### Cribado de la Librería NA06

El cribado se llevó a cabo tal como se describe anteriormente, pero con algunas modificaciones, tal como se describe a continuación. En estos cribados, 291 variantes fueron examinadas en 3 placas de 96 pocillos. En primer lugar, se añadieron muestras de 10  $\mu$ l de lisado de las placas a 180  $\mu$ l de 10 mg/ml de termolisina (Sigma) en 50 mM de tampón de imidazol de pH 7,0 con 0,005% de Tween<sup>®</sup>-20 y 10 mM de cloruro de calcio. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C para hidrolizar variantes inestables de NA05.6 (CAB1.1). Esta muestra tratada con proteasa fue utilizada para realizar el ensayo de unión CEA, tal como se describe anteriormente.

Las variantes prometedoras fueron cultivadas en 2 ml de medio tal como se describe anteriormente y las curvas de unión se obtuvieron para muestras después de tratamientos con termolisina. Una serie de variantes se han encontrado para mantener mucho más la actividad de unión después de la incubación con termolisina que el NA05.6 pariente. La tabla 3 ofrece las variantes con una resistencia a la proteasa significativamente mayor en comparación con el NA05.6 pariente.

Tabla 3. Variantes de la proteasa significativamente más resistente que NA05.6 (CAB1.1)

Clon	Mutaciones
NA06.2	R13K, T16G, W181V, L37V, E42G, A194D
NA06.4	R13K, T16G, W181V, L37V, M146V
NA06.6	R13K, T16G, W181V, L37V, M146V, K3Q
NA06.10	R13K, T16G, W181V, L37V, M146V, A194D
NA06.11	R13K, T16G, W181V, L37V, K3Q, A194D
NA06.12	R13K, T16G, W181V, L37V, E136Q

Tal como se indicó anteriormente, todas las 6 variantes tenían la mutación L37V. En cambio, esta mutación es rara en los clones seleccionados al azar de la misma librería. Las pruebas posteriores demostraron que la variante NA06.6 tuvo el mayor nivel de actividad BLA total y la mayor resistencia de la proteasa de todas las variantes. Por lo tanto, el NA06.6 fue elegido para un mayor desarrollo y designado como "CAB1.2".

### Ejemplo 2

#### Especificidad y localización de la tinción en cultivos celulares mixtos viables

En este ejemplo, se describen los experimentos realizados para determinar la especificidad y la localización de la tinción en cultivos de células mixtas usando proteína de fusión sc-Fv-BLA dirigida a CEA en células cultivadas viables. En estos experimentos, se usaron células MC38 y MC38 CEA + (células MC38 son una línea celular de fibroblastos de ratón y MC38 CEA + son los fibroblastos de un ratón transgénico que expresan el antígeno carcinoembrionario humano (CEA)). Las células de ambas líneas fueron cultivadas en medio de cultivo estándar (medio 50:50 DMEM/Fiam's F12) suplementado con 10% de suero bovino fetal, aminoácidos no esenciales, glutamina y piruvato. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, usando procedimientos estándar de cultivo celular, conocidos en la

técnica. El medio fue retirado de las células, y las células fueron lavadas en tampón fosfato salino (PBS). Se añadió beta-lactamasa-scFv de objetivo CEA con una molécula CAB (*ver* Ejemplo 1, y la Figura 12) a 1 ug/ml en PBS y se dejó unirse a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió sustrato, tal como se muestra en la Figura 2A. Las células se lavaron dos veces con PBS y MPR añadido como una solución 10um en PBS y se dejó reaccionar durante 3 minutos, en cuyo momento se levó el exceso de sustrato.

Las células fueron observadas utilizando microscopía de fluorescencia con un conjunto de filtros para tener 350 nm de excitación y 585 nm de emisión óptica. Se tomaron fotografías de las células utilizando un microscopio de fluorescencia DMRA Leica y una cámara CCD Hamamatsu Orca y la imagen fue procesada con el software Image Pro.

Los resultados se presentan en la Figura 3. Como se muestra en la Figura 3, se pueden teñir células viables no fijadas con beta-lactamasa y el sustrato y el marcado es específico para las células portadoras del antígeno. Además, esta figura muestra que hay diferencias morfológicas entre células CEA+ y no-CEA, siendo la primera alargada (célula en el lado izquierdo de la fotografía) y la última menos alargada (célula en el lado derecho no es). Usando este procedimiento, las células CEA+ se tiñeron de verde, mientras que las células no CEA no se tiñeron, pero aparecen de color rojo en fotomicrografías.

### 20 Ejemplo 3

#### *Especificidad y localización de la tinción en cultivo celular fijo mixto*

En este ejemplo, se describen experimentos realizados para determinar la especificidad y la localización de la tinción en cultivos de células mixtas usando proteína de fusión sc-Fv-BLA dirigida a CEA en células de cultivo fijadas con formaldehído. Los procedimientos utilizados fueron similares a los descritos en el Ejemplo 2. En estos experimentos, LS174T (células de carcinoma de colon CEA+ LS174T) y MRC5 (fibroblastos diploides humanos; ATCC) fueron co-cultivados tal como se describió anteriormente, fijados durante 10 minutos a temperatura ambiente, con 3% de formaldehído (Polysciences), luego se tiñeron tal como se describe en el ejemplo 1, con 0,5 ug/ml de tinte. Luego, el sustrato (*ver* la Figura 2A) se añadió en agua destilada.

Las células fueron observadas utilizando microscopía de fluorescencia con un conjunto de filtros con 350 nm de excitación y 585 nm de emisión óptica. La imagen se realizó usando un microscopio de fluorescencia DMRA Leica y una cámara CCD Hamamatsu Orca y la imagen fue procesada con el software Image Pro.

Según lo indicado por los resultados mostrados en la Figura 4, la fijación de células no afecta a la unión de la actividad catalítica de la enzima.

### 40 Ejemplo 4

#### *Especificidad y localización de la tinción en cultivo celular mixto congelado flash*

En este ejemplo, se describen los experimentos realizados para determinar la especificidad y la localización de la tinción en cultivo mixto utilizando CAB 1.2 y tejido congelado flash. Células de carcinoma de colon que expresan CEA LS174T fueron transplantadas en ratones desnudos con procedimientos conocidos en la técnica. Sesenta ratones hembras fueron implantados con el tumor de células derivadas de TLS174T mediante inyección subcutánea en suspensión en el medio DMEM a  $5 \times 10^7$  células/ml. Los animales fueron anestesiados con inhalación de isoflurano, y las células se implantaron mediante una inyección subcutánea de 100 uL células en suspensión (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ratón).

El tamaño del tumor en el momento del sacrificio fue de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. Tras el sacrificio, los tumores fueron extirpados y congelados con flash en nitrógeno líquido. Los tumores congelados fueron cortados para producir cortes de tejido de aproximadamente 10 micras de espesor en un criostato Leica usando procedimientos estándar conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Kierman, *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, Oxford University Press, [2003]). Las secciones de tejidos fueron permeabilizadas con acetona fría, secadas al aire, y luego se bloquearon con PBS con 2% de suero fetal bovino. Se aplicó CAB1.2 (1 ug/ml) en PBS/FBS durante aproximadamente 30 minutos y posteriormente se lavó. Un anticuerpo de pan-citoqueratina anti-humano disponible comercialmente (directamente marcado con isotiocianato de fluoresceína, DAKO; clon MNF116) se utilizó específicamente para marcar las células humanas de cáncer y aplicarse simultáneamente con CAB1.2 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió sustrato (*ver* la Figura 2A). Posteriormente, los tejidos fueron lavados con PBS para eliminar la proteína de fusión no unida y el anticuerpo y se añadió el sustrato MPR en agua destilada.

Tal como se describió anteriormente, las células fueron observadas utilizando microscopía de fluorescencia con un conjunto de filtros con 350 nm de excitación y 585 nm de emisión óptica. La imagen se realizó con un microscopio de fluorescencia DMRA Leica y una cámara CCD Hamamatsu Orca y la imagen fue procesada con el software Image Pro.

## ES 2 337 382 T3

Tal como se muestra en la Figura 5, la actividad de unión y enzimática no se ven afectadas por la congelación de los tejidos. De manera similar, la figura también muestra que el etiquetado de la proteína de fusión y el sustrato es específico y limitado a tejido de cáncer humano (citoqueratina positiva, CEA positivo) y los tejidos del ratón no normales (CEA y citoqueratina negativa). Finalmente, tal como se muestra en la Figura 5, la tinción de la proteína-sustrato no reacciona de manera cruzada con el tejido del ratón y el sustrato no se une específicamente a los tejidos del ratón.

### Ejemplo 5

#### *Chip humano y de tejido (TMA) que comprende tejidos normales y cancerígenos*

En este ejemplo, se describe el desarrollo de chips de tejidos. Se obtuvieron chips de tejido incrustadas en parafina de fuentes comerciales (Cemicon). Tras la desparafinización en xileno, deshidratación en etanol, y rehidratación en agua siguiendo los procedimientos habituales, los TMAs fueron bloqueados en PBS/FBS y se aplicó CAB 1,2 a 1 ug/ml. La unión se realizó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, seguido de un lavado en PBS y agua destilada. El sustrato se aplicó a 10 uM durante 5 minutos y las diapositivas se lavaron abundantemente en agua destilada.

Las diapositivas fueron observadas utilizando un reproductor de imágenes de modelo BioRad XF ajustado para excitación UV y filtro de paso largo 500 (Leica). Las diapositivas fueron clasificadas a ojo a nivel bruto de la expresión de antígenos (en una escala 0-4, no a alta expresión, fluorescencia de sustrato). Estos resultados fueron correlacionados con los tipos de tejido, sobre la base de la clave del proveedor de TMA.

Los resultados se muestran en la Figura 6. La figura 6A muestra la tinción TMA, mientras que la figura 6B muestra la intensidad de la tinción. El eje y indica la intensidad de la tinción media/área de tinción, mientras que el eje x muestra el tipo de tejido.

### Ejemplo 6

#### *Observación a Gran aumento de TMA*

En este ejemplo, se describen los experimentos realizados en dos muestras de tejido. Dos secciones de tejidos individuales de TMA descrito anteriormente han sido fotografiadas con mayor aumento. Este mayor aumento se realizó con un modelo de reproductor de imágenes BioRad FX con excitación UV y un filtro de paso largo 500.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Se observó una excelente tinción específica de la enfermedad (cáncer de colon), pero no en tejido normal de colon humano (ambos en la misma disposición). Además, hubo una buena relación señal:ruido para el BLA objetivo y el sustrato.

### Ejemplo 7

#### *Tinción específica de tejido de colon de mono normal incrustado en parafina con CAB1.2*

En este ejemplo, se describen los experimentos realizados para observar la coloración específica de los tejidos normales de mono incrustados en parafina con CAB 1.2. Tras la desparafinización en xileno, la deshidratación en etanol, y la rehidratación en agua siguiendo los procedimientos habituales, los tejidos fueron bloqueados en PBS/FBS, y se aplicó CAB 1.2 en 1 ug/ml. La unión se realizó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, seguido de un lavado en PBS y agua destilada. Se aplicó sustrato en 10 uM durante 5 minutos y las diapositivas se lavaron con agua destilada. Tras la tinción, los tejidos se montaron en PBS que contenía 1 ng/ml de yoduro de propidio (rojo) como contraste.

Los tejidos se observaron con un microscopio Leica DMRA equipado con filtros espectrales (Qdot 525 y juegos de filtros Qdot585; Omega) y se usó un reproductor de imágenes modelo BioRad FX gel usando excitación UV y filtro de paso largo 500.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Como se indica en la figura 8, hay un patrón definido y específico de la tinción.

### Ejemplo 8

#### *Tinción de TMA Múltiple para cribado de disposición de tejidos de alto rendimiento*

En este ejemplo, se describen los experimentos realizados para desarrollar procedimientos de tinción TMA múltiples para cribado de disposición de tejido de alto rendimiento para la expresión de antígenos específicos en tejidos

enfermos y normal. En primer lugar, 10 disposiciones de tejido (Ardais) se prepararon y se tiñeron simultáneamente para expresión de CEA, tal como aquí se describen. Tras la desparafinización en xileno, la deshidratación en etanol, y la rehidratación en agua siguiendo los procedimientos habituales, los TMA's fueron bloqueados en PBS/FBS y se aplicó CAB 1.2 en 1 ug/ml. La unión se realizó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, seguido de un lavado en PBS y agua destilada. Se aplicó sustrato (*ver* la Figura 2A) en 10 uM durante 5 minutos y las diapositivas se lavaron en agua destilada.

Las diapositivas fueron observadas utilizando un reproductor de imágenes de gel de documentación BioRad y las imágenes fueron procesadas con el software de QuantityOne (BioRad). Los resultados se muestran en la Figura 9. Estos resultados indican que el uso de CAB1.2 y sustrato permitió una tinción rápida y la evaluación de múltiples TMA's.

#### Ejemplo 9

Procedimiento para el acoplamiento de beta-lactamasa a anticuerpos

En este ejemplo, se describe un procedimiento para el acoplamiento de beta-lactamasa a anticuerpos. En algunas realizaciones, la beta-lactamasa biotinilada se une a un anticuerpo biotinilado, que a su vez se une a un objetivo de antígeno específico, utilizando avidina o estreptavidina, tal como se muestra en la Figura 10. En este formato, cualquier antígeno para el que existe un anticuerpo biotinilado se puede teñir con beta-lactamasa y sustrato. En algunas realizaciones, esto se logra mediante la unión de anticuerpos biotinilados primarios para apuntar a células/tejidos utilizando los procedimientos estándar (*véase por ejemplo*, Boenisch (ed.), Handbook of Immunochemical Staining Methods, DAKO Corp., [2001]), y a continuación lavando anticuerpos no unidos y añadiendo biotina o avidina y permitiendo la unión a los anticuerpos. Después de lavar la estreptavidina no unida, se añade beta-lactamasa biotinilada, y se deja que se una a la estreptavidina. La beta-lactamasa no unida se retira y se añade sustrato.

#### Ejemplo 10

Tinción *In Vivo*

En este ejemplo, se describen los experimentos para mostrar la tinción *in vivo* usando los procedimientos de la presente invención. Se trataron ratones con tumores de xenoinjertos de CEA+ (células de carcinoma de colon LS174T, ATCC) con CAB 1.2 (*es decir*, una lactamasa específicas dirigidas a CEA), en 0,5 mg/Kg. Luego, 24 horas más tarde, se inyectaron en ratones anestesiados, un sustrato de lactamasa fluorescente y el sustrato se permitió circular durante unos 10 minutos. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los tejidos se observaron con un reproductor de imágenes de 2000 mm Kodak con filtros de excitación y de emisión apropiados para fluoróforos. Se usaron varios espectros de excitación y emisión, (por ejemplo, emisión 525 nm, excitación 514 nm y emisión 650 nm; *ver* la Figura 17). Las imágenes fueron recogidas y procesadas con hardware y software asociado con el microscopio. Los resultados se muestran en la Figura 16.

Los expertos en la materia fácilmente aprecian que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y las ventajas mencionadas, así como los que aquí inherentes. Los complejos moleculares y los procedimientos, procedimientos, tratamientos, moléculas, compuestos específicos que se describen aquí representan actualmente las realizaciones preferidas, son a modo de ejemplo, y no están previstas como limitaciones en el alcance de la invención.

#### 50 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

#### 55 Documentos de patente citados en la descripción

- US 5443986 A [0004]
- 60 • US 20040115742 A [0005]
- EP 0379048 A [0006]
- US 4458066 A [0035]
- 65 • US 9002545 W [0055]
- US 4946778 A [0056]

- US 4522811 A [0085]
- US 6261535 B [0102]
- 5 • US 5061620 A [0106]
- US 5677136 A [0106]
- 10 • US 5750397 A [0106]

**Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción**

- **Goodman; Gilman.** The Pharmacological Basis of Therapeutics. *McGraw Hill*, 1996 [0015][0072][0095]
- 15 • **Singleton; Sainsbury.** Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. *John Wiley and Sons*, 1994 [0022]
- **Hale; Marham.** The Harper Collins Dictionary of Biology. *Harper Perennial*, 1991 [0022]
- 20 • **Goodchild.** *Bioconjugate Chem.*, 1990, vol. 1, 165-187 [0035]
- **Narang et al.** *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 90-99 [0035]
- **Brown et al.** *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 109-151 [0035]
- 25 • **Beaucage et al.** *Tetrahedron Lett.*, 1981, vol. 22, 1859-1862 [0035]
- **Harlow; Lane.** Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* [0054]
- **Köhler; Milstein.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0054]
- 30 • **Kozbor et al.** *Immunol. Today*, 1983, vol. 4, 72 [0054]
- **Cole et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. *Alan R. Liss, Inc*, 1985, 77-96 [0054]
- 35 • **Cote et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 2026-2030 [0055]
- **Cole et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. *Alan R. Liss*, 1985, 77-96 [0055]
- 40 • **Huse et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0056]
- **Sambrook et al.** Molecular Cloning Methods. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0088]
- **Bosslet et al.** *Br. J. Cancer*, 1992, vol. 65, 234-238 [0088]
- 45 • **Goshorn.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 2123-2127 [0088]
- **Senter et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1993, vol. 4, 3-9 [0088]
- **DeSutter et al.** *Mol. Immunol.*, 1994, vol. 31, 261-267 [0088]
- 50 • **Rodrigues et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 63-70 [0088]
- **Svensson et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 2357-2365 [0088]
- 55 • **Kerr et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 3558-3563 [0088]
- **Siemers et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1997, vol. 8, 510-519 [0088]
- **Giovannangeli.** *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2000, vol. 2, 288-96 [0089]
- 60 • **Vasquez et al.** *Trends Biochem Sci.*, 1988, vol. 23, 4-9 [0089]
- **Nielsen et al.** *Curr. Med. Chem.*, 2001, vol. 8, 545-50 [0089]
- 65 • **Matteucchi.** *Ciba Found Symp.*, 1997, vol. 209, 5-14 [0089]
- **Summerton.** *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.*, 1997, vol. 7, 63-70 [0089]

## ES 2 337 382 T3

- **Stein et al.** *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.*, 1997, vol. 7, 151-7 [0089]
- **Burgstaller et al.** *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2002, vol. 5, 690-700 [0089]
- 5 • **Crawford et al.** *Brief Funct. Genomic Proteomic*, 2003, vol. 2, 72-9 [0089]
- **Ferrara et al.** *Nat. Med.*, 1999, vol. 5, 1359 [0109]
- **Gerber et al.** *Nat. Med.*, 1999, vol. 5, 623 [0109]
- 10 • van **Zant**. *Microchip Fabrication. McGraw-Hill*, 2000 [0117]
- **Boehm et al.** *Biochem. J.*, 2000, vol. 346, 519-528 [0122]
- 15 • **Zorbas; Lottspeich.** *Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag*, 1998, 233-241 [0124]
- **Kierman.** *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. Oxford University Press*, 2003 [0146]
- 20 • *Handbook of Immunochemical Staining Methods. DAKO Corp*, 2001 [0159]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *ex vivo* para detectar al menos un objetivo en una célula, que comprende las etapas de:

a) proporcionar al menos una célula de prueba que tenga al menos un objetivo;

b) exponer dicha al menos una célula de prueba a un agente dirigido, de manera que se une el agente dirigido al objetivo para formar un objetivo unido;

i) en donde dicho agente se conjuga a una enzima  $\beta$ -lactamasa; o

ii) en donde dicho agente se conjuga a una molécula reportera y el procedimiento también comprende proporcionar una enzima  $\beta$ -lactamasa que se une a dicho objetivo unido;

c) exponer dicho objetivo unido a un sustrato capaz de separarse mediante la enzima para producir un producto fluorescente de precipitación en condiciones tales que la enzima separa dicho sustrato para producir dicho producto; y

d) detectar dicho producto.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha al menos una célula de prueba se ha obtenido de un animal.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que al menos una célula de prueba es una célula humana.

4. Utilización de un agente dirigido en por lo menos una célula que tiene al menos un objetivo, una enzima  $\beta$ -lactamasa, y un sustrato capaz de ser separado mediante la enzima para producir un producto fluorescente de precipitación, para la fabricación de una composición de imágenes ópticas en un paciente;

i) en donde dicho agente se conjuga a una enzima  $\beta$ -lactamasa, o

ii) en donde dicho agente se conjuga a una molécula reportera y la enzima  $\beta$ -lactamasa es capaz de formar un complejo con un objetivo unido mediante dicho agente conjugado.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la utilización según la reivindicación 4, en el que el agente dirigido se selecciona del grupo formado por anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la utilización según la reivindicación 4, en el que la molécula reportera es biotina.

7. Procedimiento o utilización según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo y la beta-lactamasa forman una proteína de fusión.

8. Procedimiento o utilización según la reivindicación 7, en el que la proteína de fusión es una proteína de fusión que consiste en la cadena pesada de SEQ ID NO: 3 enlazada directamente con el enlace de SEQ ID NO: 5 enlazado directamente con la cadena ligera de SEQ ID NO: 4 enlazado directamente con la secuencia BLA de SEQ ID NO: 6.

9. Procedimiento o utilización según la reivindicación 7, en el que la proteína de fusión es una variante de la proteína de fusión según la reivindicación 8 que tiene una resistencia a la proteasa mejorada.

10. Procedimiento o utilización según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo comprende una mutación L37V, en comparación con la secuencia de la proteína de fusión según la reivindicación 8.

11. Procedimiento o utilización según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo comprende una serie de mutaciones seleccionadas entre:

a) R13K, T16G, W181V, L37V, E42G, A194D;

b) R13K, T16G, W181V, L37V, M146V;

c) R13K, T16G, W181V, L37V, M146V, K3Q;

d) R13K, T16G, W181V, L37V, M146V, A194D;

## ES 2 337 382 T3

e) R13K, T16G, W181V, L37V, K3Q, A194D;

f) R13K, T16G, W181V, L37V, E136Q,

5 en comparación con la secuencia de la proteína de fusión según la reivindicación 8.

12. Procedimiento o utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el objetivo comprende al menos un marcador de cáncer.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Secuencia de Aminoácido de Proteína BLA**

1 TPVSEKQLAE VVANTITPLM KAQSVPGMAV AVIYQGKPHY YTFGKADIAA  
 51 NKPVTPQTLF ELGSISKFTF GVLGGDAIAR GEISLDDAVT RYWPQLTGKQ  
 101 WQGIRMLDLA TYTAGGLPLQ VPDEVTDNAS LLRFYQNWQP QWKPGTTRLY  
 151 ANASIGLFGA LAVKPSGMPY EQAMTTRVLK PLKLDHTWIN VPKAEAAHYA  
 201 WGYRDGKAVR VSPGMLDAQA YGVKTNVQDM ANWVMANMAP ENVADASLKQ  
 251 GIALAQSRYW RIGSMYQGLG WEMLNWPVEA NTVVETSFGN VALAPLPVAE  
 301 VNPPAPPVKA SWVHKTGSTG GFGSYVAFIP EKQIGIVMLA NTSYPNPARV  
 351 EAAYHILEAL Q (SEQ ID NO:2)

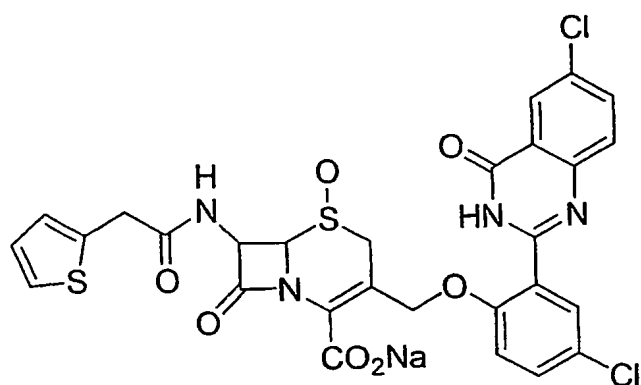
**FIG. 1A**

**Secuencia de Nucleótido de Gen BLA**

1 ACACCGGTGT CAGAAAAACA GCTGGCGGAG GTGGTCGCGA ATACGATTAC  
 51 CCCGCTGATG AAAGCCCAGT CTGTTCCAGG CATGGCGGTG GCCGTTATTT  
 101 ATCAGGGAAA ACCGCACTAT TACACATTTG GCAAGGCCGA TATCGCGGCG  
 151 AATAAACCCG TTACGCCTCA GACCCTGTTT GAGCTGGGTT CTATAAGTAA  
 201 AACCTTCACC GCGTTTTATG GTGGGGATGC CATTGCTCGC GGTGAAATTT  
 251 CGCTGGACGA TCGCGTGACC AGATACTGGC CACAGCTGAC GGGCAAGCAG  
 301 TGGCAGGGTA TTCGTATGCT GGATCTCGCC ACCTACACCG CTGGCGGCCCT  
 351 GCCGCTACAG GTACCGGATG AGGTCACGGA TAACGCCTCC CTGCTGCGCT  
 401 TTTATCAAAA CTGGCAGCCG CAGTGGAAAG CTGGCACAAC GCGTCTTTAC  
 451 GCCAACGCCA GCATCGGTCT TTTTGGTGCG CTGGCGGTCA AACCTTCTGG  
 501 CATGCCCTAT GAGCAGGCCA TGACGACGCG GGTCCTTAAG CCGCTCAAGC  
 551 TGGACCATAC CTGGATTAAC GTGCCGAAAG CGGAAGAGGC GCATTACGCC  
 601 TGGGGCTATC GTGACGGTAA AGCGGTGCGC GTTTCGCCCG GTATGCTGGA  
 651 TGCACAAGCC TATGGCGTGA AAACCAACGT GCAGGATATG GCGAACTGGG  
 701 TCATGGCAAA CATGGCGCCG GAGAACGTTG CTGATGCCTC ACTTAAGCAG  
 751 GGCATCGCGC TGGCGCAGTC GCGTACTGGC CGTATCGGGT CAATGTATCA  
 801 GGGTCTGGGC TGGGAGATGC TCAACTGGCC CGTGGAGGCC AACACGGTGG  
 851 TCGAGACGAG TTTTGGTAAT GTAGCACTGG CGCCGTTGCC CGTGGCAGAA  
 901 GTGAATCCAC CGGCTCCCCC GGTCAAAGCG TCCTGGGTCC ATAAAACGGG  
 951 CTCTACTGGC GGGTTTGGCA GCTACGTGGC CTTTATTCCT GAAAAGCAGA  
 1001 TCGGTATTGT GATGCTCGCG AATACAAGCT ATCCGAACCC GGCACGCGTT  
 1051 GAGGCGGCAT ACCATATCCT CGAGGCGCTA CAG (SEQ ID NO:1)

**FIG. 1B**

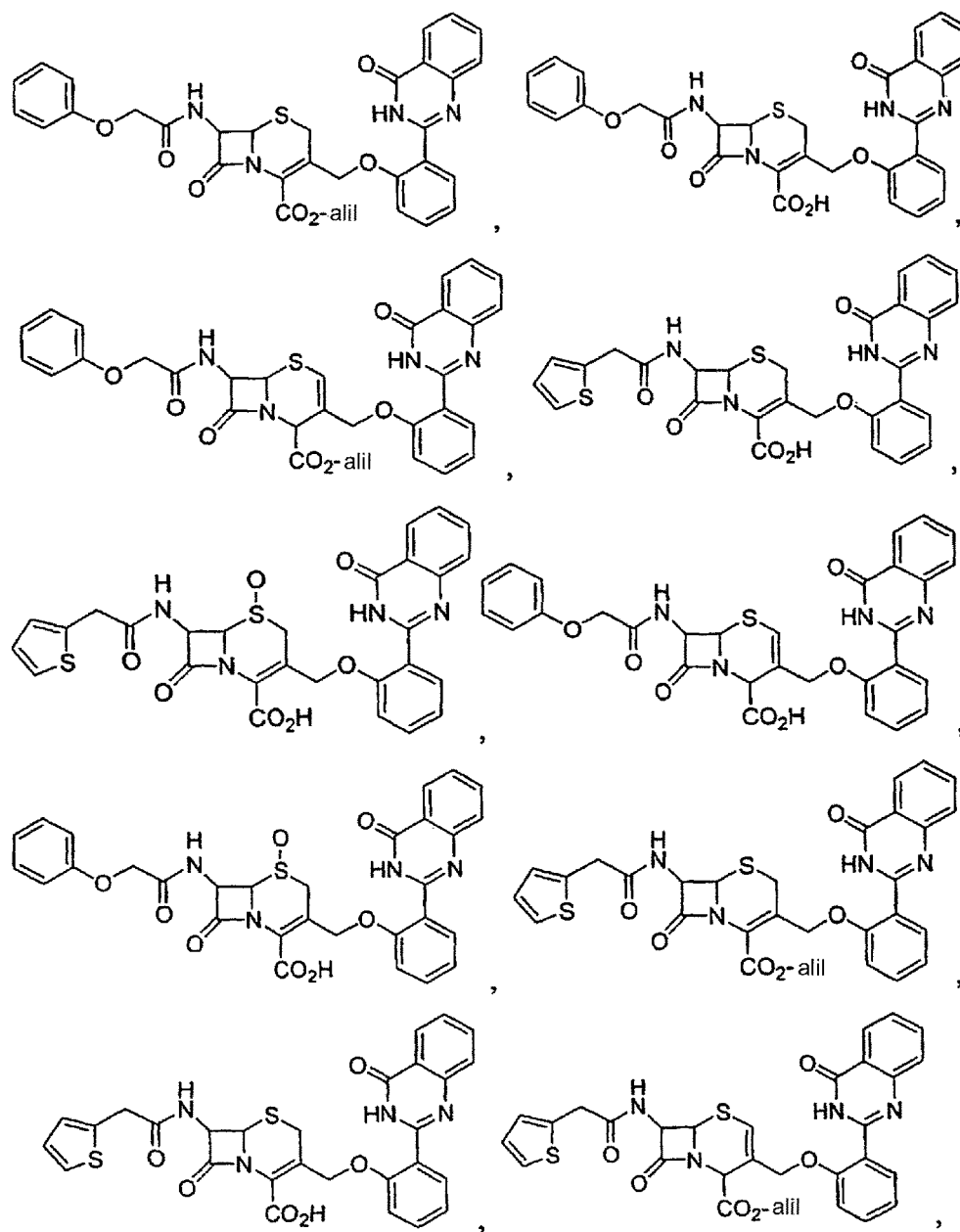
Reportero de Lactamasa Fluorogénica de Precipitación



MPR 71439

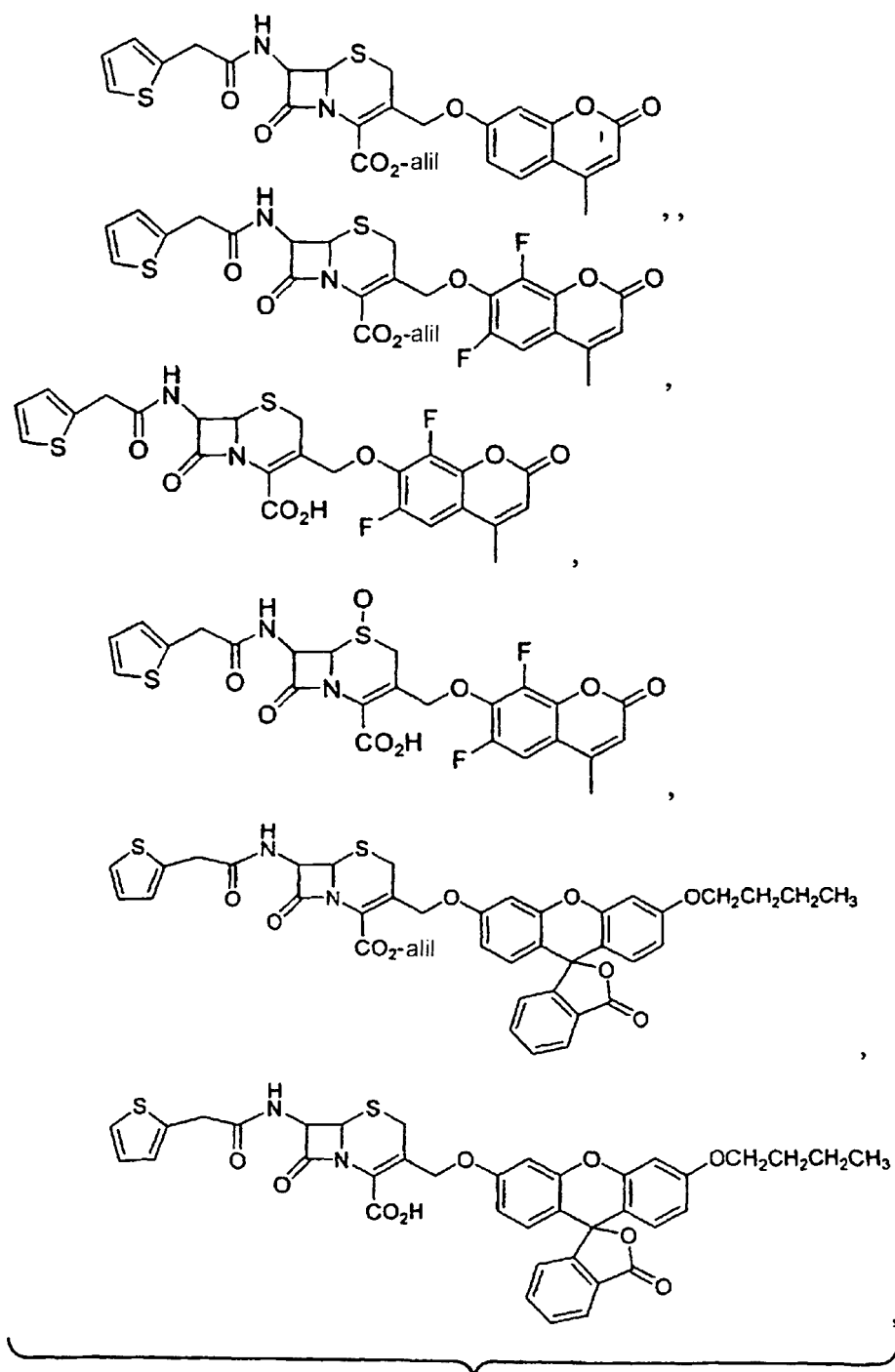
7-(2-tienilaetamido)-3-(3-(3-(6-cloro-4(3H)-quinazolinona)  
4-clorofeniloximetil- $\Delta^3$ -cefem-4-ácido carboxílico. S-óxido

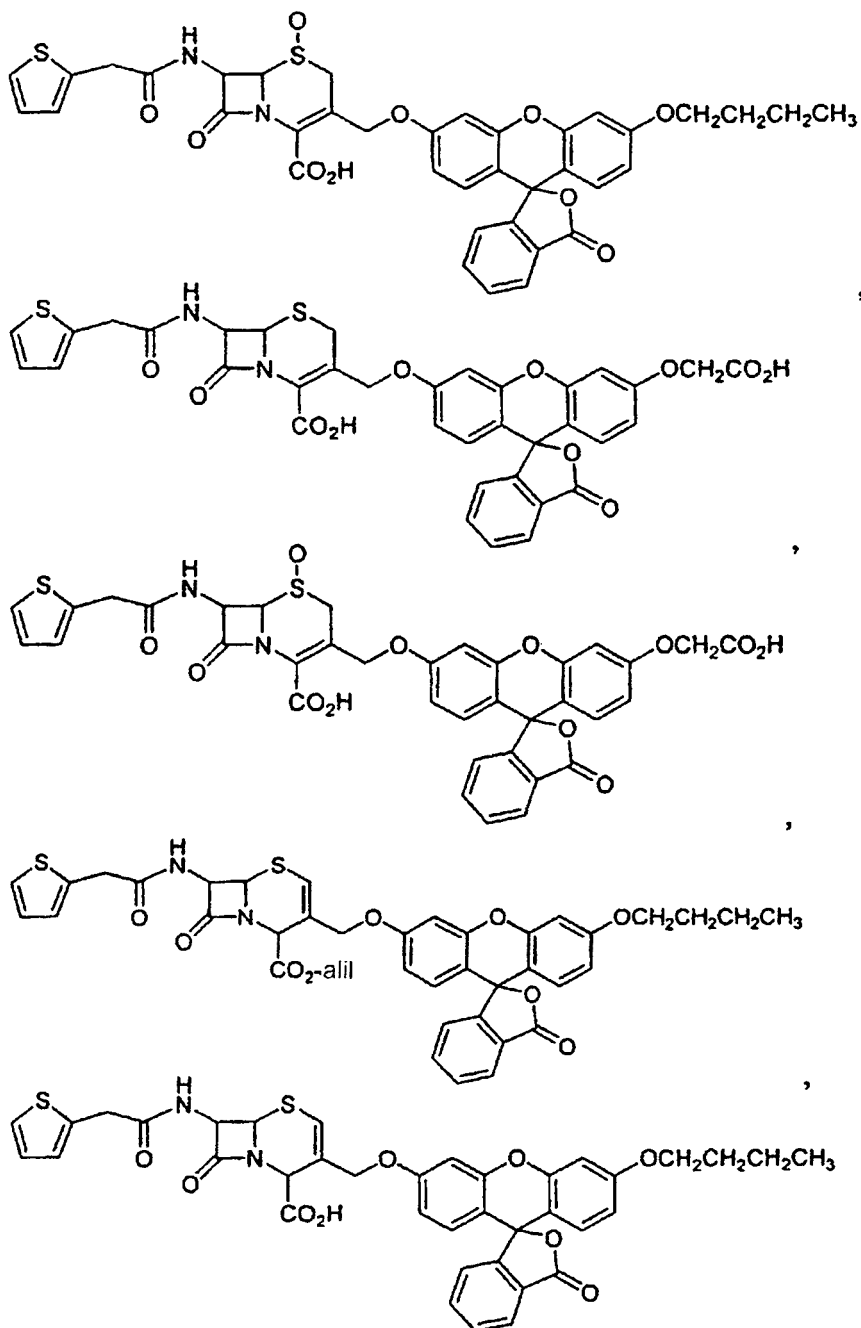
**FIG. 2A**



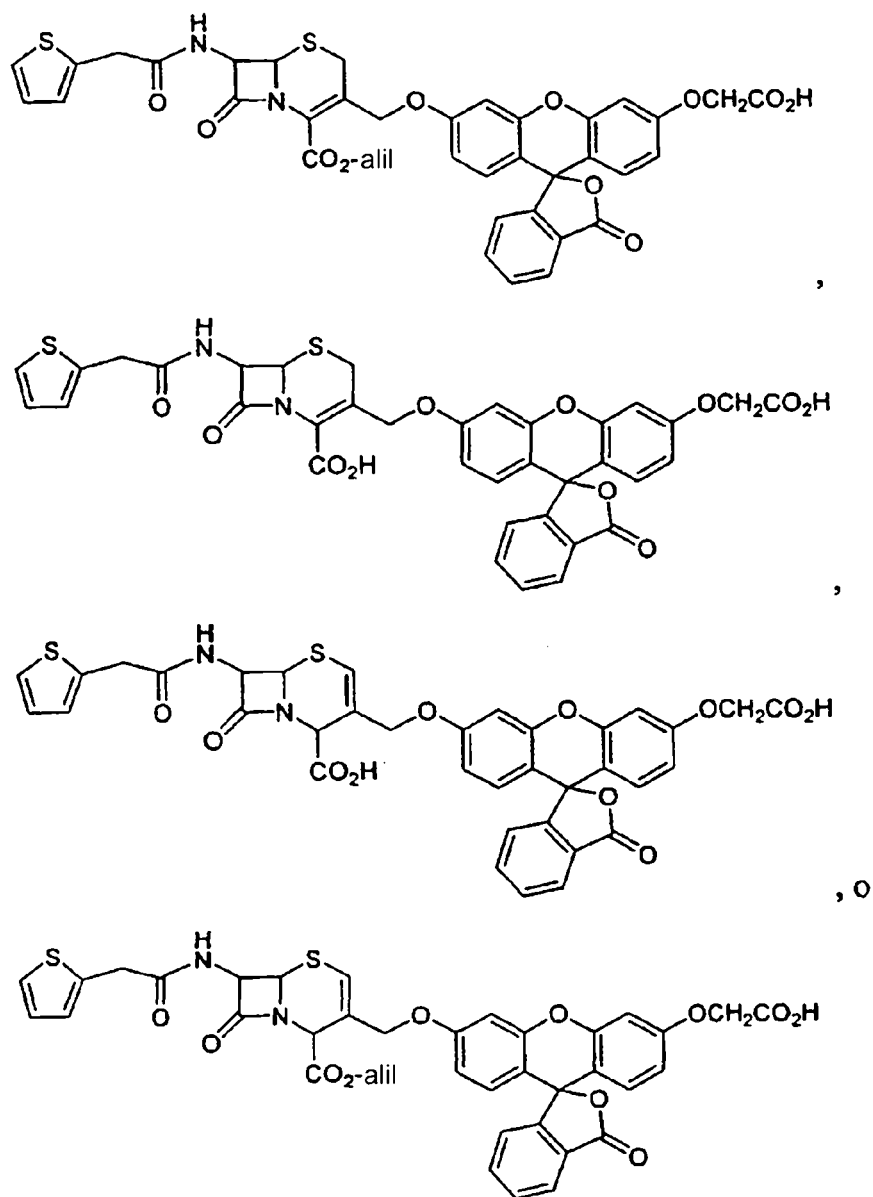
**FIG. 2B**







**FIG. 2E**



**FIG. 2F**

Teñido Celular Viable en Cultivo Mezclado de Fibroblastos de Ratón positivos en CEA y negativos en CEA

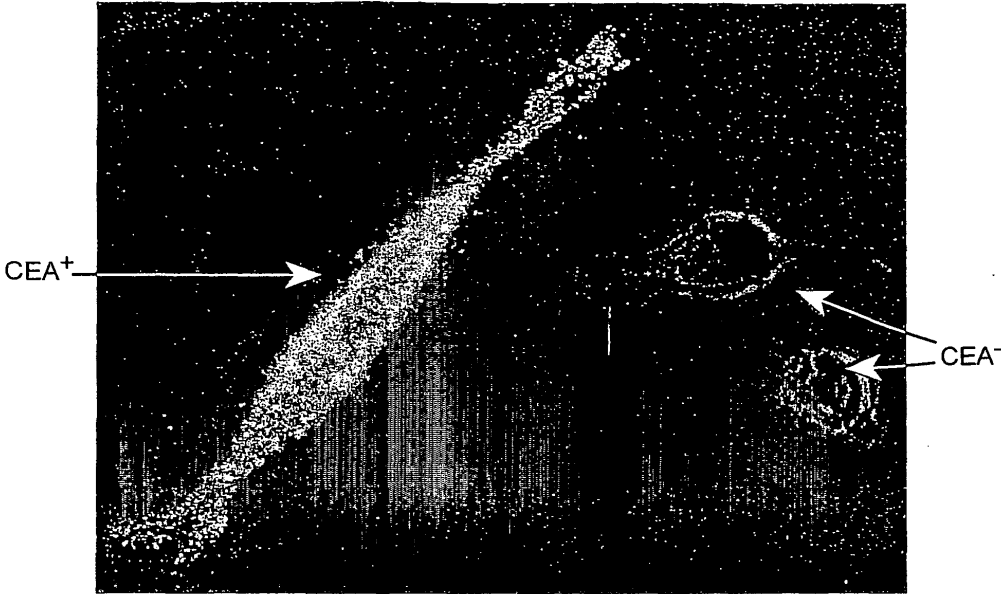


FIG. 3

Chip de Tejido Humano (TMS) que Comprende Tejidos Normales y Cancerígenos

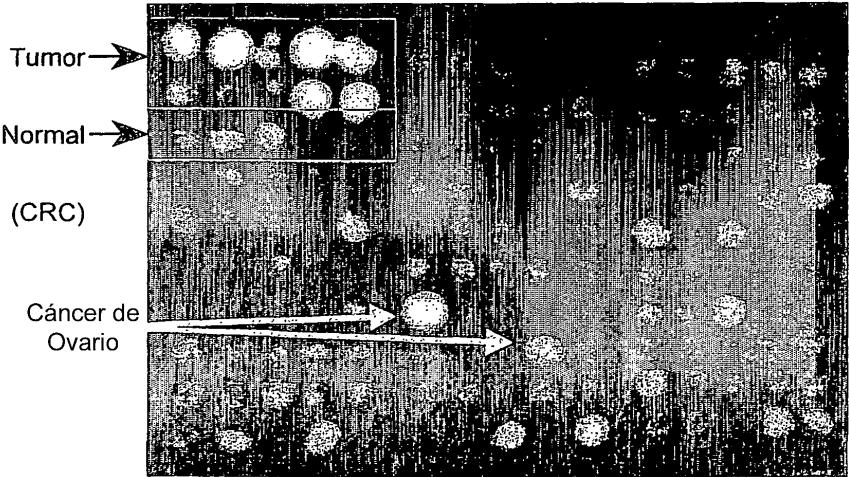
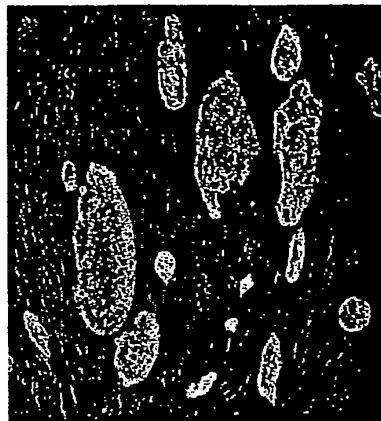


FIG. 6A

Modelo Celular LS174T/MRC5 Mezclado  
Modelo Célula Tumoral/Estroma

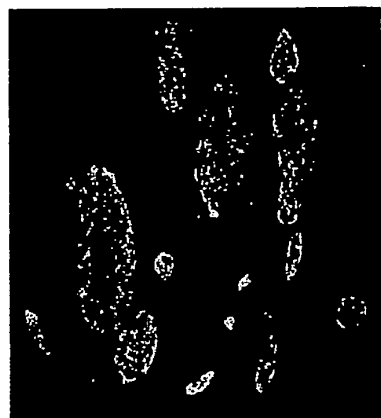


Combinado

LS174T. Células MRC5 de carcinoma de colon que expresan CEA. Las células de fibroblastos diploides humanas primarias se fijaron, lavaron y trataron con Cab1.2 (0.5ug/ml), se lavaron y trataron con repórtero durante 5 minutos.

**FIG. 4C**

Modelo Celular LS174T/MRC5 Mezclado  
Modelo Célula Tumoral/Estroma

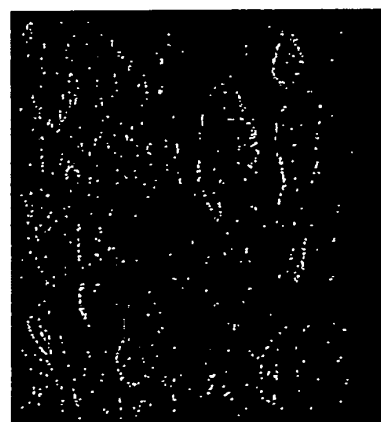


Fluorescencia

LS174T. Células MRC5 de carcinoma de colon que expresan CEA. Las células de fibroblastos diploides humanas primarias se fijaron, lavaron y trataron con Cab1.2 (0.5ug/ml), se lavaron y trataron con repórtero durante 5 minutos.

**FIG. 4B**

Modelo Celular LS174T/MRC5 Mezclado  
Modelo Célula Tumoral/Estroma

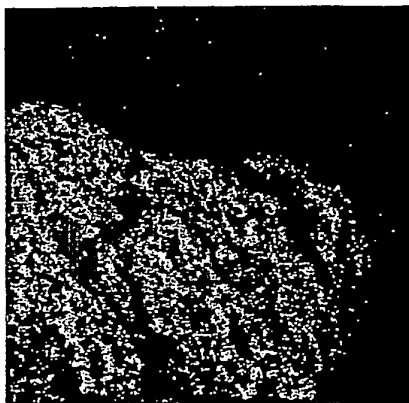


Fase

LS174T. Células MRC5 de carcinoma de colon que expresan CEA. Las células de fibroblastos diploides humanas primarias se fijaron, lavaron y trataron con Cab1.2 (0.5ug/ml), se lavaron y trataron con repórtero durante 5 minutos.

**FIG. 4A**

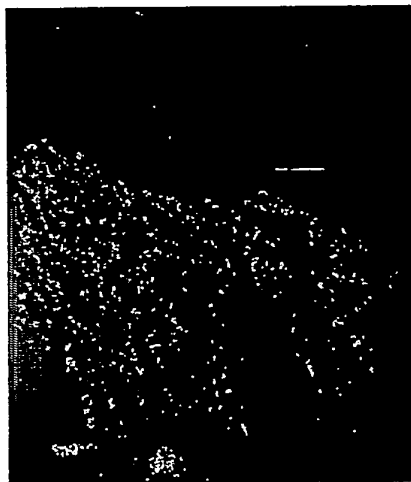
Co-localización de  
Citoqueratina y Cab1.2  
(Sustrato) en Sección  
de Xenoinjerto Congelada



Sustrato

**FIG. 5A**

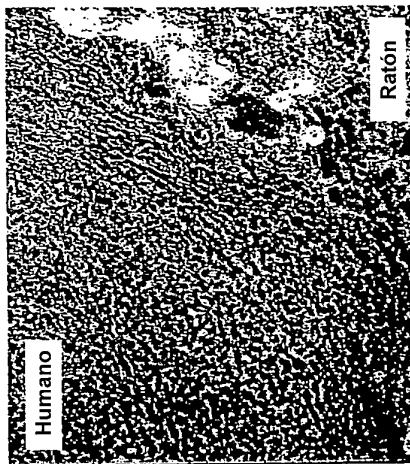
Co-localización de  
Citoqueratina y Cab1.2  
(Sustrato) en Sección  
de Xenoinjerto Congelada



Pan-citoqueratina

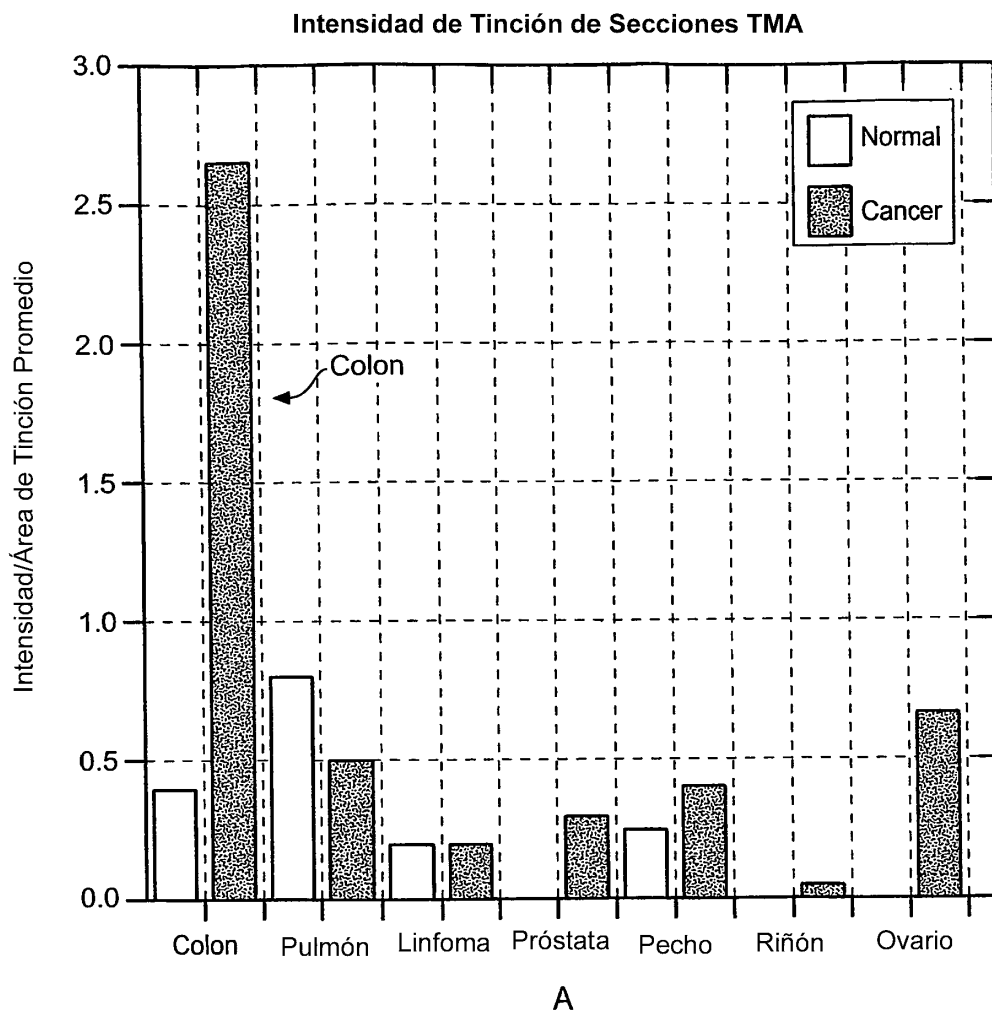
**FIG. 5B**

Co-localización de  
Citoqueratina y Cab1.2  
(Sustrato) en Sección  
de Xenoinjerto Congelada

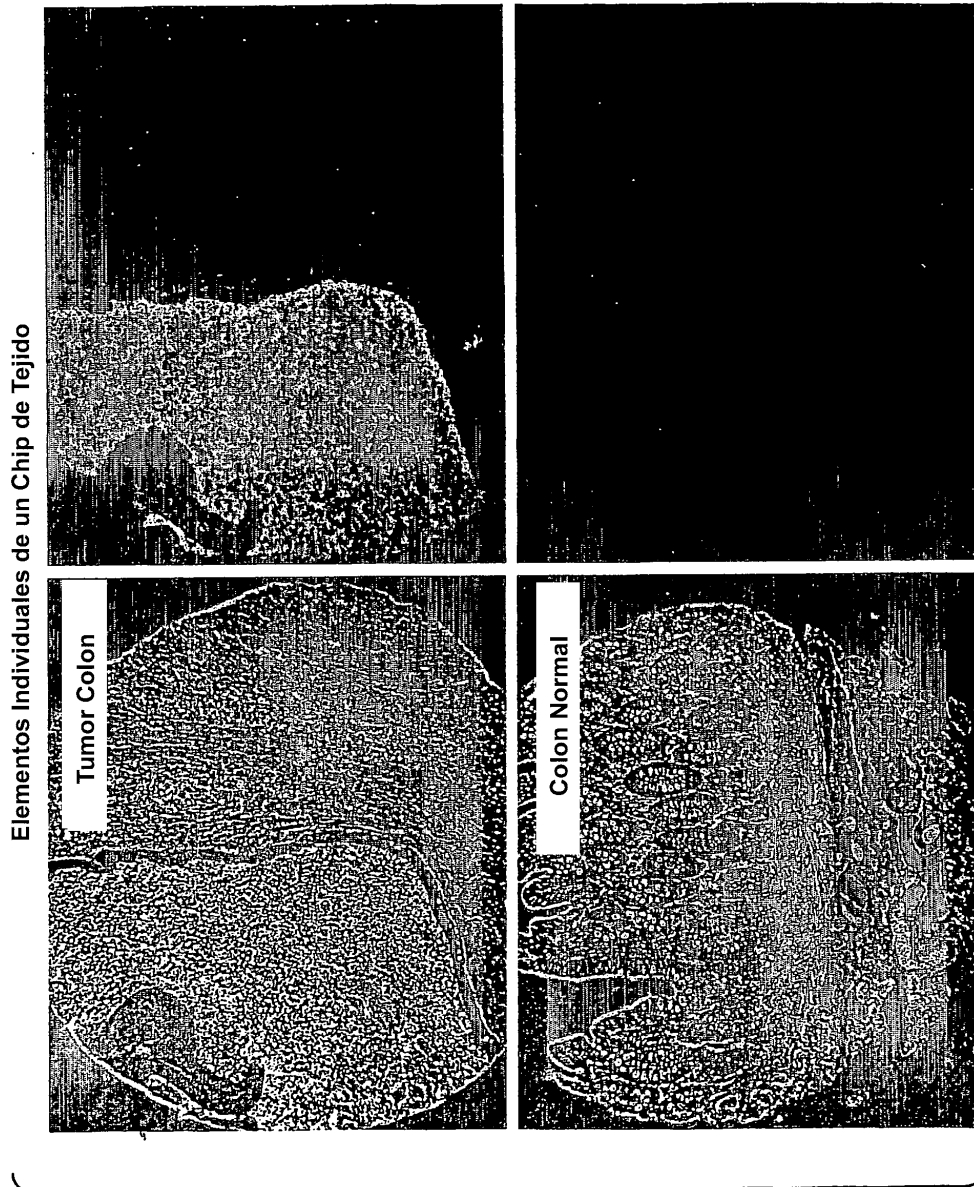


Fase

**FIG. 5C**

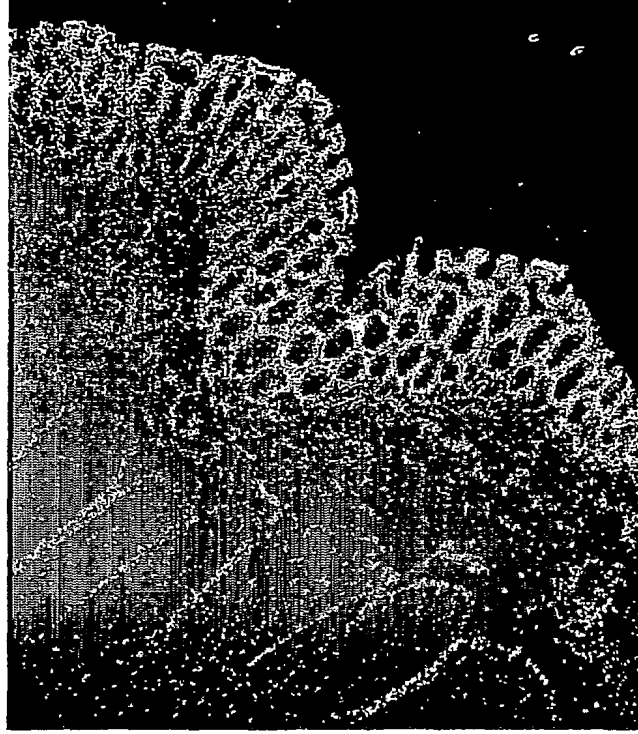


**FIG. 6B**



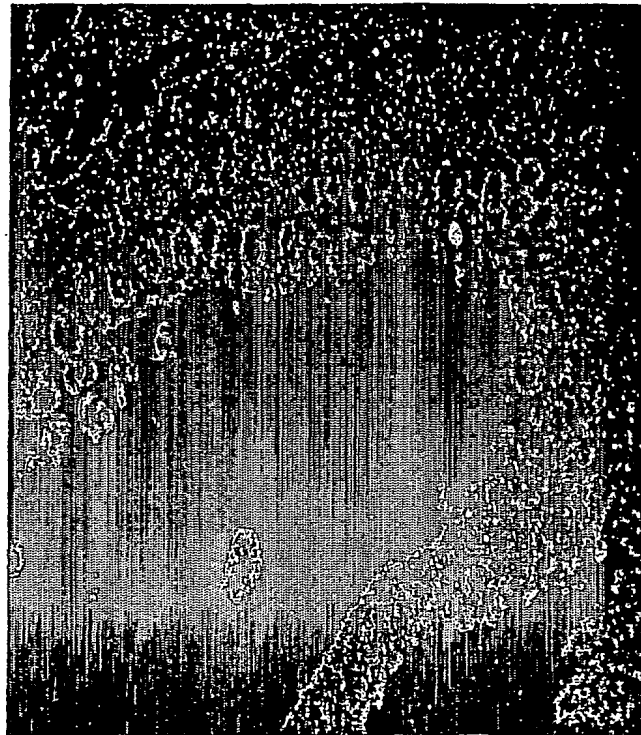
**FIG. 7**

Colon de Mono Cinomólogo Normal  
+bla+ sustrato



**FIG. 8B**

Colon de Mono Cinomólogo Normal  
-bla+ sustrato



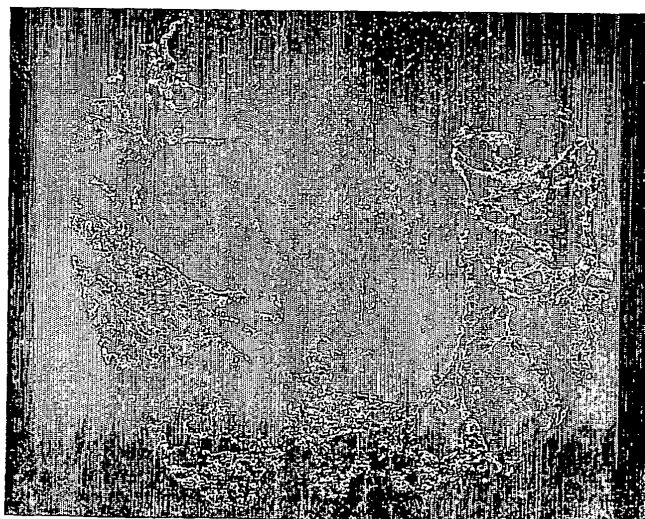
**FIG. 8A**

HTS-TMA'S



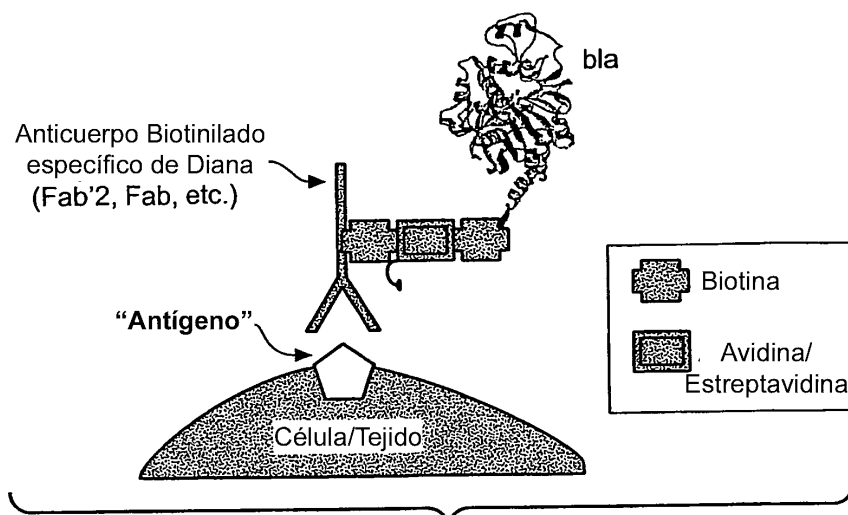
**FIG. 9**

Tejido de Cáncer de Colon Humano incrustado en Parafina Teñido con anti-CEA Biotinilada (Biomed), Estreptavidina y bla Biotinilado seguido por el Sustrato

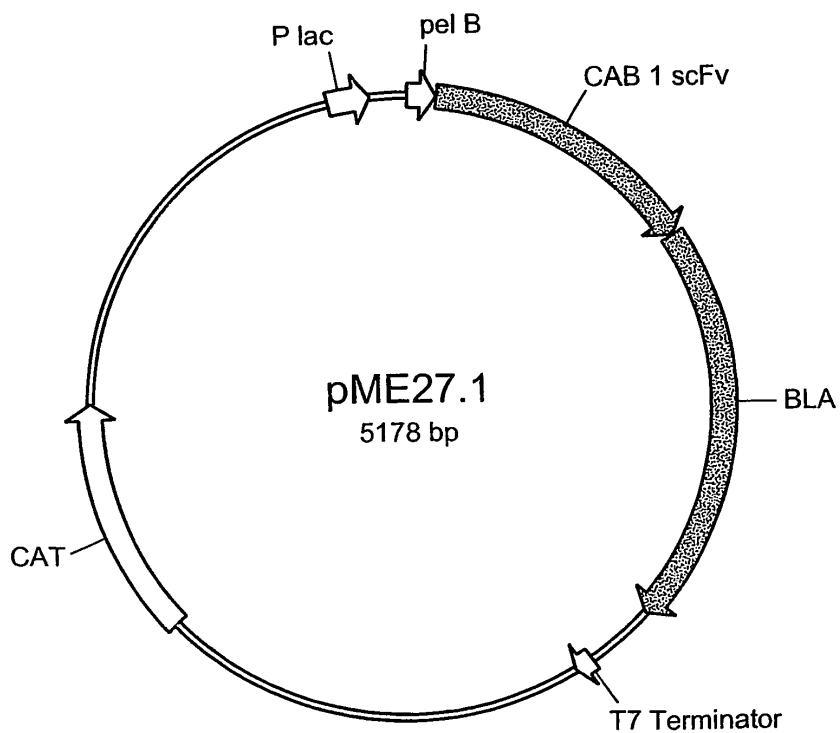


**FIG. 11**

**Procedimiento General para Acoplar bla a Anticuerpos**  
 Anticuerpo específico de Diana Biotinilado Acoplado a  
 bla Biotinilado usando Avidina o Estreptavidina



**FIG. 10**



**FIG. 12A**



ES 2 337 382 T3

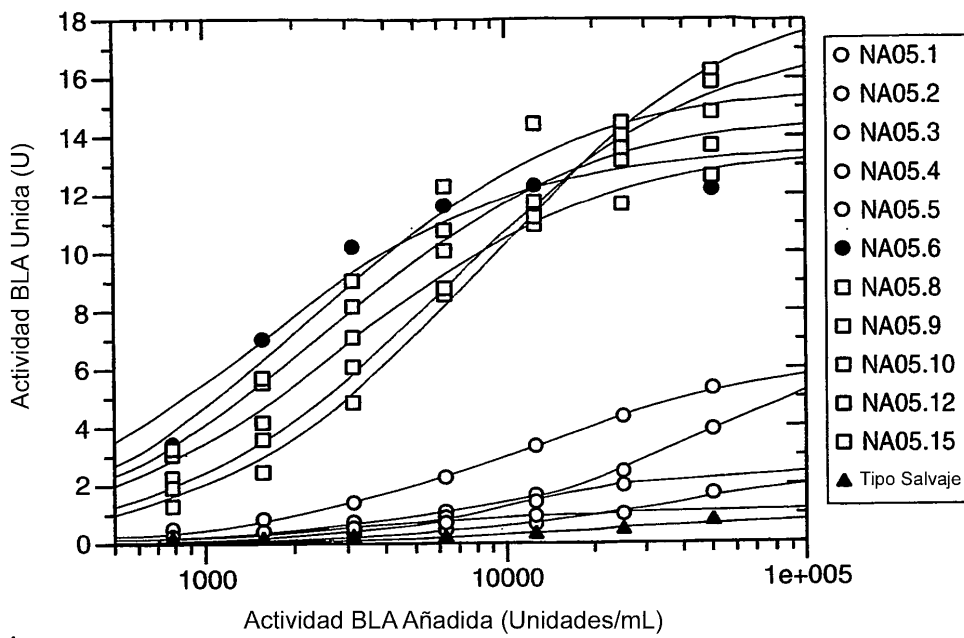
48	185	V	0.481	M		I	0.173	L	0.124				I			
49	185	G	0.600	S	0.216	A	0.162	E	0.005	L	0.005	I	0.005	G		
50	185	R	0.146	W	0.146	V	0.119	A	0.114	G	0.081	Y	0.081	W	H2	
51	185	I	0.822	T	0.081	R	0.027	V	0.022	K	0.016	M	0.011	I	H2	
52	184	S	0.250	Y	0.239	N	0.123	K	0.060	I	0.054	D	0.050	D	H2	
52a	141	-	0.230	P	0.180	Y	0.153	G	0.126	N	0.066	V	0.055	P	H2	
52b	34	-	0.814	K	0.115	R	0.060	G	0.005	Y	0.005				H2	
52c	22	-	0.880	T	0.044	V	0.033	S	0.022	A	0.011	G	0.005		H2	
53	184	S	0.228	D	0.163	Y	0.125	G	0.109	N	0.082	H	0.054	E	H2	
54	183	G	0.328	S	0.202	D	0.129	N	0.112	K	0.082	F	0.055	N	H2	
55	182	G	0.544	S	0.181	D	0.085	W	0.066	Y	0.060	N	0.020	G	H2	
56	182	S	0.231	D	0.182	N	0.147	T	0.143	Y	0.077	G	0.060	D	H2	
57	184	T	0.582	K	0.120	N	0.065	A	0.054	I	0.054	P	0.022	T	H2	
58	183	Y	0.322	N	0.216	D	0.139	R	0.060	H	0.055	T	0.038	E	H2	
59	184	Y	0.908	F	0.043	N	0.016	S	0.011	D	0.005	G	0.005	Y	H2	
60	183	A	0.579	N	0.153	S	0.104	T	0.055	R	0.044	G	0.027	A	H2	
61	184	D	0.277	P	0.239	Q	0.174	A	0.141	V	0.076	T	0.033	P	H2	
62	185	S	0.686	K	0.146	P	0.065	N	0.038	G	0.016	R	0.016	K	H2	
63	186	V	0.511	L	0.247	F	0.215	S	0.011	A	0.005	K	0.005	F	H2	
64	186	K	0.581	Q	0.274	R	0.054	N	0.032	E	0.022	T	0.022	Q	H2	
65	186	G	0.688	S	0.237	T	0.032	A	0.016	D	0.011	E	0.011	G	H2	
66	186	R	0.935	Q	0.054	H	0.005	I	0.005					K		1
67	186	F	0.462	V	0.409	I	0.065	L	0.054	A	0.005	S	0.005	A		1
68	186	T	0.914	I	0.038	A	0.016	S	0.011	K	0.005	N	0.005	T		
69	187	I	0.791	M	0.139	V	0.032	D	0.005	F	0.005	G	0.005	F		1
70	187	S	0.684	T	0.214	N	0.070	L	0.032					T		
71	187	R	0.529	V	0.160	A	0.107	P	0.064	T	0.053	K	0.043	T		1
72	186	D	0.902	N	0.071	K	0.016	E	0.011					D		
73	185	T	0.368	N	0.266	D	0.177	K	0.070	E	0.059	A	0.011	T		
74	186	S	0.946	A	0.048	L	0.005							S		
75	187	K	0.674	T	0.139	I	0.070	R	0.027	A	0.021	F	0.021	S		1
76	187	N	0.701	S	0.251	K	0.027	R	0.011	T	0.005	Y	0.005	N		
77	187	T	0.615	Q	0.273	S	0.048	M	0.021	L	0.016	P	0.011	T		
78	186	L	0.364	A	0.273	F	0.235	V	0.096	I	0.005	M	0.005	A		
79	187	Y	0.638	S	0.239	F	0.059	V	0.048	H	0.005	M	0.005	Y		
80	187	L	0.782	M	0.207	N	0.005	-	0.005					L		
81	187	Q	0.529	E	0.205	K	0.122	R	0.032	T	0.032	N	0.027	Q		
82	194	M	0.497	L	0.421	W	0.051	V	0.015	I	0.010	-	0.005	L		
82a	195	N	0.442	S	0.291	R	0.077	T	0.066	D	0.053	G	0.020	S		
82b	194	S	0.795	N	0.082	R	0.051	G	0.026	T	0.021	A	0.010	S		
82c	197	L	0.701	V	0.234	M	0.041	G	0.010	A	0.005	D	0.005	L		
83	197	R	0.528	T	0.239	K	0.122	D	0.041	E	0.020	Q	0.015	T		
84	198	A	0.495	P	0.182	S	0.177	T	0.051	I	0.035	V	0.030	S		
85	198	E	0.591	A	0.172	D	0.126	S	0.051	V	0.045	G	0.015	E		
86	198	D	0.975	T	0.010	V	0.010	N	0.005					D		
87	198	T	0.929	S	0.035	G	0.010	M	0.010	A	0.005	Q	0.005	T		
88	198	A	0.939	G	0.040	P	0.005	T	0.005	V	0.005	Y	0.005	A		
89	198	V	0.768	L	0.066	M	0.056	T	0.045	I	0.040	F	0.010	V		
90	199	Y	0.980	F	0.010	A	0.005	I	0.005					Y		
91	199	Y	0.930	F	0.045	C	0.015	R	0.005	T	0.005			Y		
92	198	C	0.990	A	0.005	M	0.005							C		
93	198	A	0.838	T	0.076	V	0.061	H	0.005	K	0.005	N	0.005	N		1
94	198	R	0.596	K	0.162	T	0.051	G	0.045	P	0.045	Q	0.025	E		1
95	161	G	0.174	D	0.120	E	0.099	A	0.093	N	0.092	P	0.068	G		
96	159	P	0.168	R	0.130	G	0.112	L	0.062	V	0.062	Y	0.062	T	H3	
97	156	G	0.170	P	0.094	V	0.094	E	0.088	T	0.069	S	0.063	P	H3	
98	155	G	0.152	Y	0.101	L	0.095	D	0.087	V	0.076	S	0.063	T	H3	

FIG. 13A

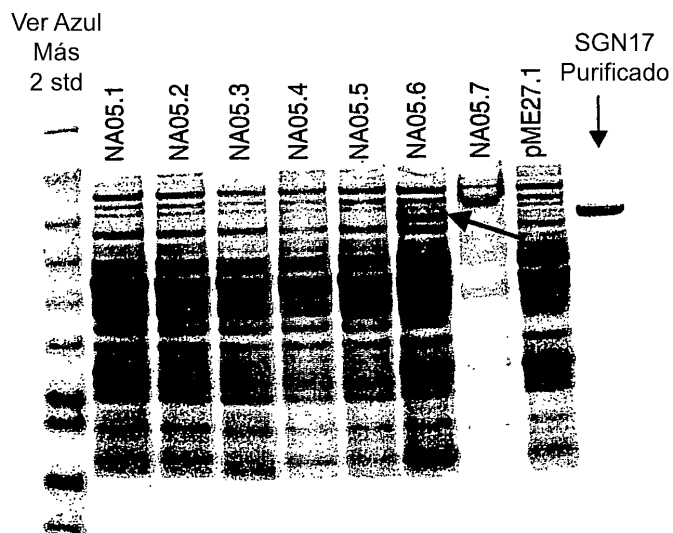
ES 2 337 382 T3

Pos. Cadena Ligera	Número de Observaciones	Frecuencias Observadas de los 5 Aminoácidos Más Abundantes en la Alineación de Secuencias Humanas											Secuencia		Res. mutados	
		CAB1	CDR										CAB1	CDR		
1	95	Q	0.589	S	0.158	N	0.095	H	0.074	D	0.053	F	0.021	E		1
2	139	S	0.446	Y	0.388	F	0.101	V	0.043	L	0.014	T	0.007	N		1
3	140	V	0.307	E	0.243	A	0.207	M	0.093	D	0.064	I	0.043	V		
4	140	L	0.971	V	0.029									L		
5	141	T	0.915	A	0.021	S	0.021	I	0.014	K	0.007	L	0.007	T		
6	140	Q	0.993	E	0.007									Q		
7	139	P	0.906	D	0.029	S	0.029	A	0.022	E	0.014			S		1
8	139	P	0.741	A	0.137	H	0.072	R	0.029	L	0.007	S	0.007	P		
9	139	S	0.964	A	0.014	V	0.014	R	0.007					A		1
10	0	-	1.000											I		1
11	138	V	0.790	A	0.138	L	0.058	M	0.014					M		1
12	139	S	0.978	F	0.007	T	0.007	E	0.004	Q	0.004			S		
13	138	V	0.406	G	0.348	A	0.138	E	0.087	L	0.014	D	0.007	A		
14	135	S	0.630	A	0.230	T	0.111	D	0.007	F	0.007	G	0.007	S		
15	135	P	0.881	L	0.089	A	0.022	S	0.007					P		
16	134	G	0.978	E	0.015	L	0.007							G		
17	133	Q	0.811	K	0.098	A	0.045	E	0.024	G	0.015	H	0.008	E		1
18	133	T	0.504	S	0.263	R	0.135	K	0.068	E	0.008	G	0.008	K		1
19	130	V	0.454	A	0.385	I	0.146	G	0.008	L	0.008			V		
20	128	T	0.531	R	0.188	S	0.148	K	0.047	I	0.031	M	0.016	T		
21	121	I	0.901	V	0.050	L	0.017	A	0.008	F	0.008	M	0.008	I		
22	120	S	0.492	T	0.475	A	0.008	G	0.008	I	0.008	N	0.008	T		
23	117	C	1.000											C		
24	112	S	0.536	T	0.259	G	0.089	A	0.045	Q	0.033	I	0.018	S	L1	
25	108	G	0.870	L	0.056	R	0.028	A	0.019	I	0.009	P	0.009	A	L1	
26	108	D	0.339	S	0.250	T	0.213	N	0.087	E	0.037	G	0.037	S	L1	
27	104	S	0.415	N	0.118	K	0.113	A	0.104	T	0.066	G	0.047	S	L1	
28	104	L	0.346	S	0.346	I	0.115	G	0.067	A	0.058	D	0.019	S	L1	
29	100	G	0.243	N	0.239	D	0.159	S	0.078	P	0.068	H	0.058	V	L1	
30	103	I	0.291	V	0.165	D	0.136	N	0.107	E	0.058	S	0.049	S	L1	
31	101	G	0.356	K	0.168	A	0.099	E	0.084	Q	0.084	D	0.069	Y	L1	
31a	54	-	0.438	S	0.167	G	0.104	N	0.083	Y	0.063	D	0.052	M	L1	
31b	49	-	0.495	N	0.227	Y	0.155	S	0.041	G	0.021	H	0.021	H	L1	
31c	23	-	0.760	N	0.134	S	0.031	K	0.021	D	0.012	E	0.010		L1	
31d	0	-	1.000												L1	
31e	0	-	1.000												L1	
31f	0	-	1.000												L1	
32	94	Y	0.515	S	0.134	F	0.093	A	0.072	T	0.052	H	0.041		L1	
33	97	V	0.680	A	0.186	I	0.082	Y	0.021	F	0.010	P	0.010		L1	
34	92	S	0.380	H	0.120	A	0.109	Y	0.098	N	0.076	Q	0.076		L1	
35	98	W	0.990	Y	0.010									W		
36	96	Y	0.844	F	0.073	H	0.073	W	0.010					F		1
37	95	Q	0.916	R	0.042	E	0.011	H	0.011	K	0.011	Y	0.011	Q		
38	94	Q	0.862	H	0.053	L	0.053	E	0.011	K	0.011	V	0.011	Q		
39	93	K	0.333	L	0.172	R	0.161	H	0.151	Q	0.086	V	0.043	K		
40	93	P	0.946	S	0.022	A	0.011	L	0.011	R	0.011			P		

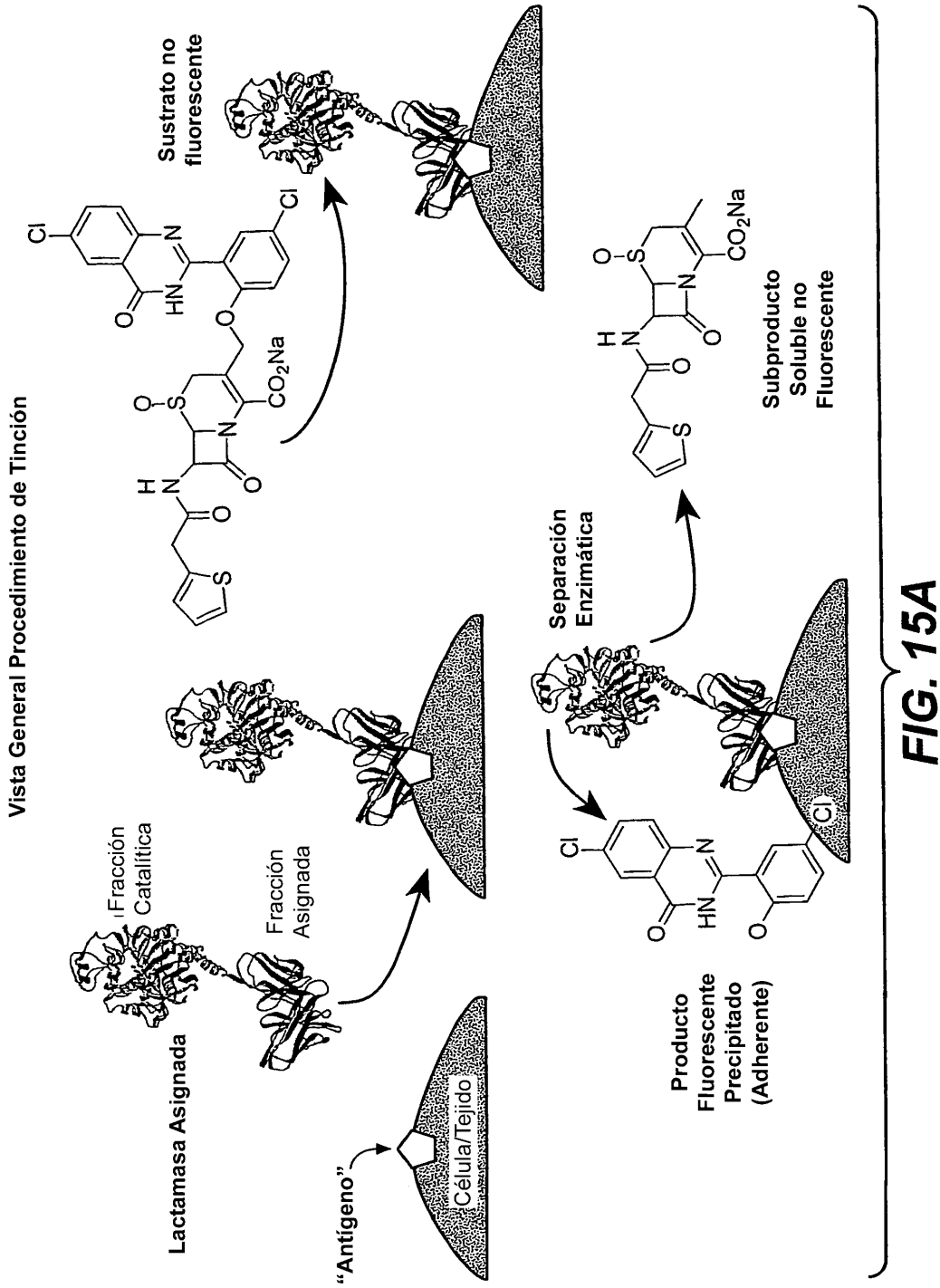
FIG. 13B



**FIG. 14A**



**FIG. 14B**



Sistema de Imágenes

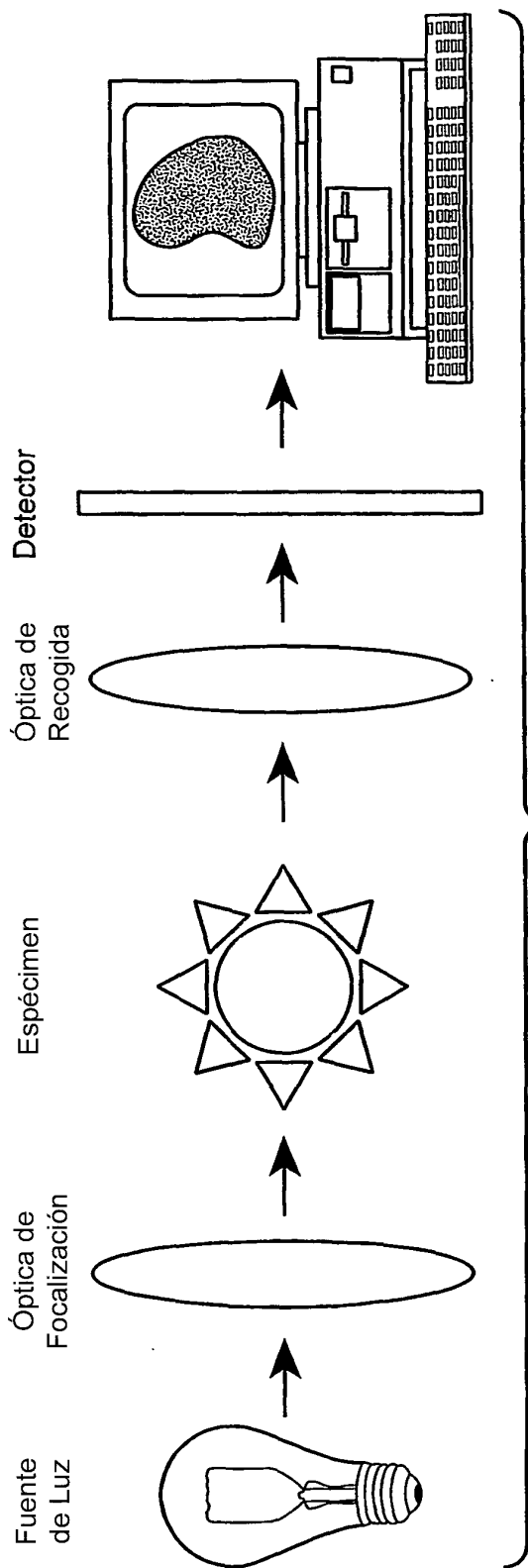
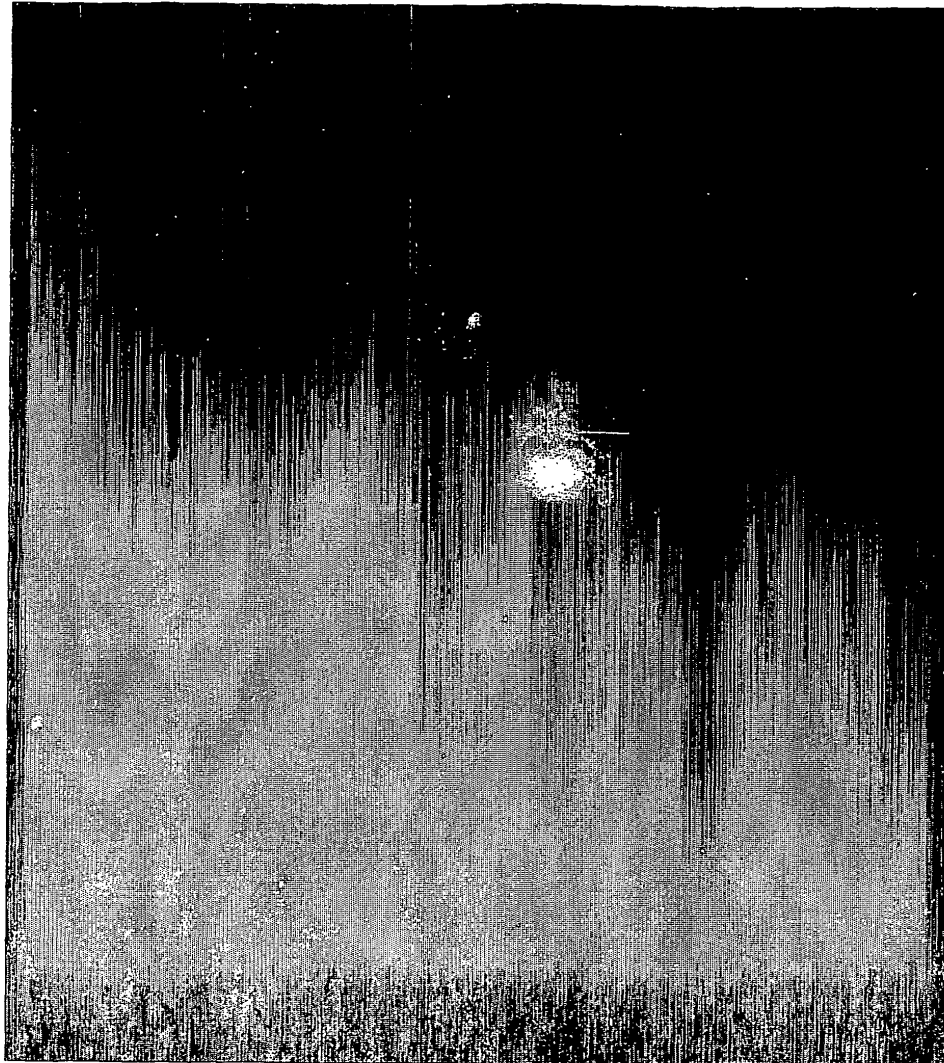
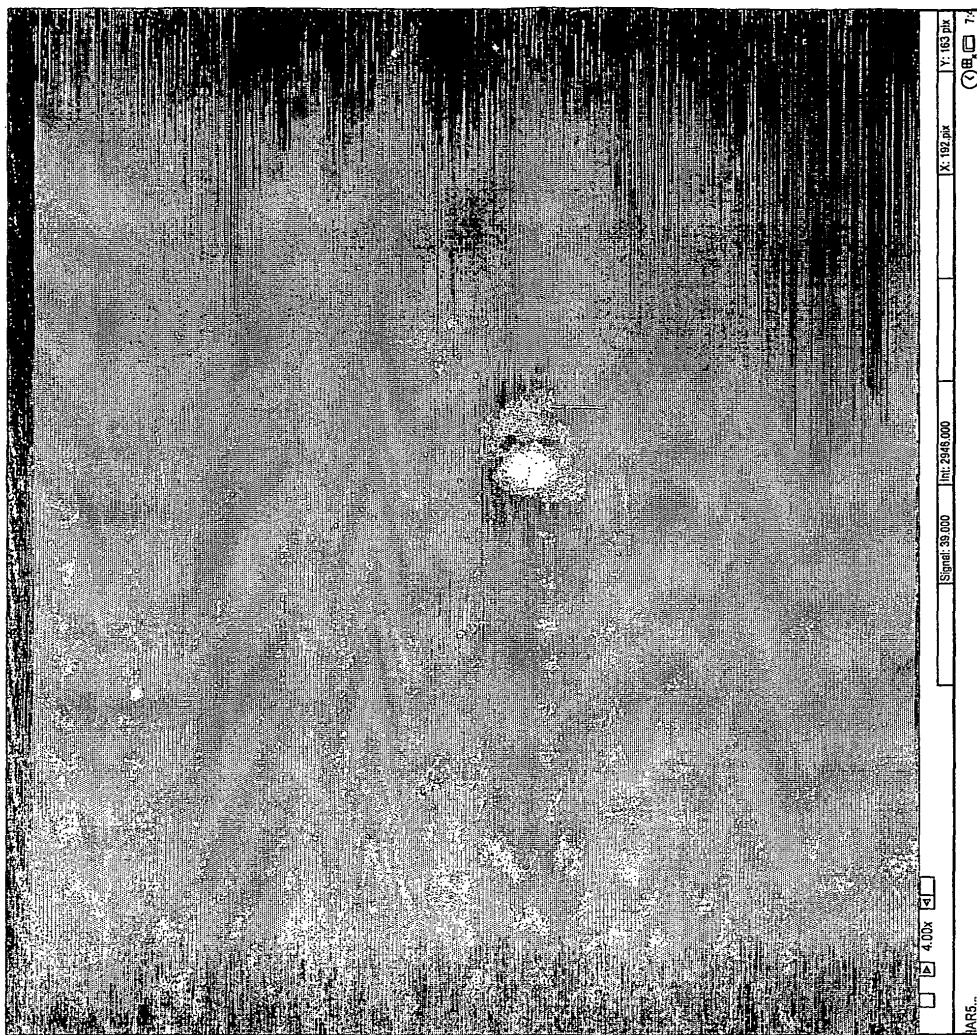


FIG. 15B



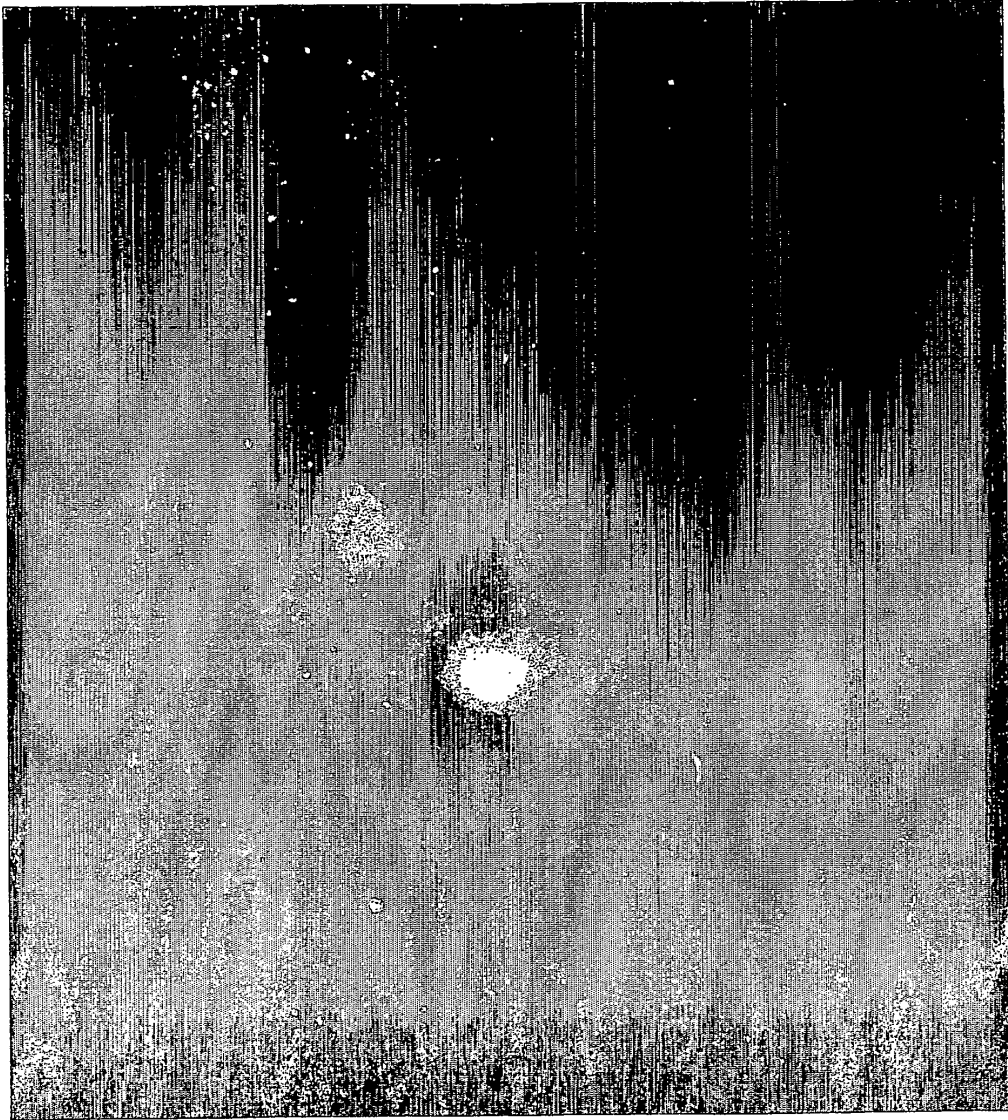
114AR -  
Excitación 535:  
Emisión 600

FIG. 16A



114AR -  
Excitación 535:  
Emisión 670

FIG. 16B



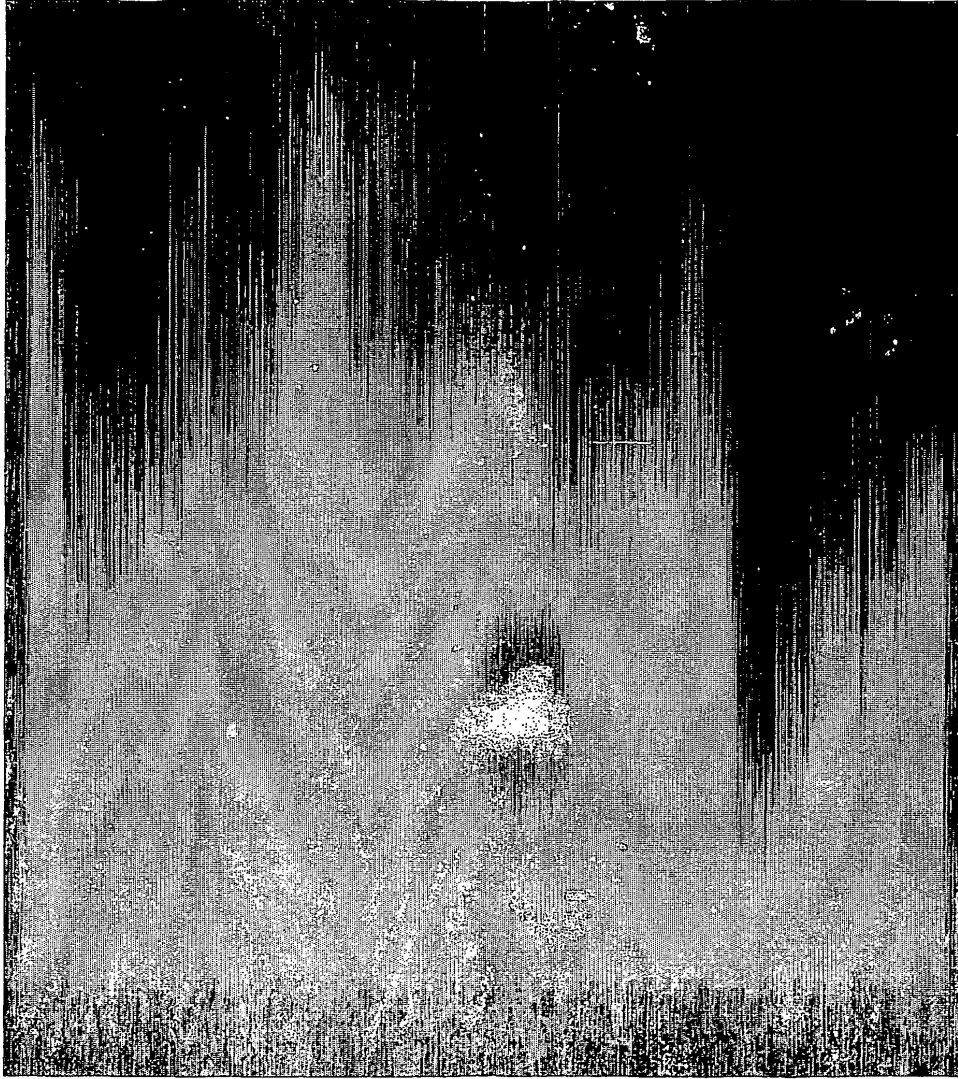
114AR -  
Excitación 535:  
Emisión 670

FIG. 16C



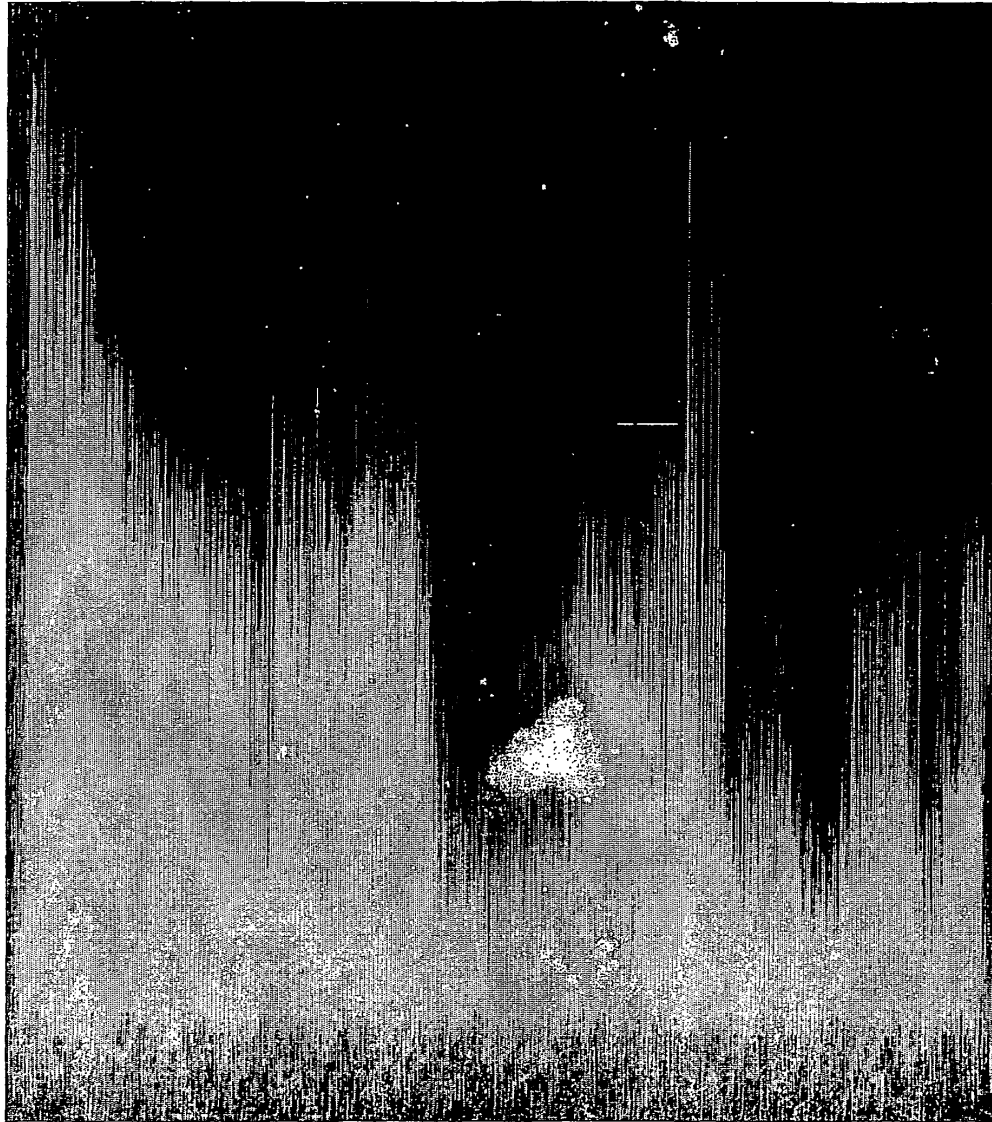
114AR -  
Excitación 625:  
Emisión 670

FIG. 16D



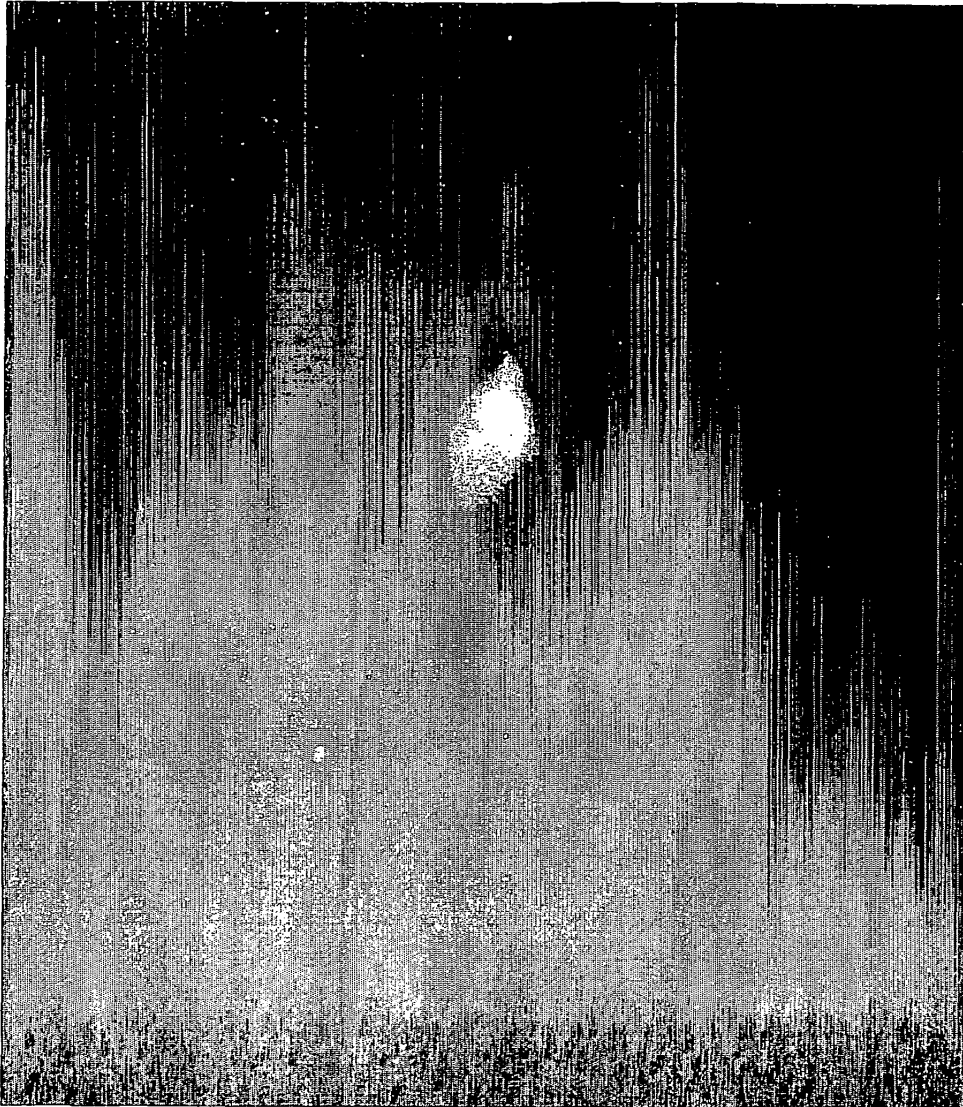
116AR/146AR -  
Excitación 465:  
Emisión 535

FIG. 16E



116AR/146AR -  
Excitación 465:  
Emisión 600

FIG. 16F



116AR/146AR -  
Excitación 535:  
Emisión 600

**FIG. 16G**